



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**O PAPEL DA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* NA ETIOLOGIA
DAS DOENÇAS SISTÉMICAS E ORAIS**

Trabalho submetido por

Beatriz Carrilho Gaudino

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**O PAPEL DA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* NA ETIOLOGIA
DAS DOENÇAS SISTÉMICAS E ORAIS**

Trabalho submetido por

Beatriz Carrilho Gaudino

para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof. Doutor Nuno Eduardo Moura dos Santos da Costa Taveira

outubro de 2022

Dedicatória

*“If you wanna make the world a better place, take a look at yourself and
then make a change.”*

Michael Jackson

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Nuno Taveira, pelo seu empenho, rigor, disponibilidade e atenção ao longo da realização desta dissertação.

Agradecer também ao Instituto Universitário Egas Moniz, que foi a minha segunda casa, durante estes últimos 5 anos e onde aprendi e cresci.

O agradecimento mais especial vai para os meus pais que fizeram os possíveis e impossíveis para que eu realizasse este meu sonho de ser Médica Dentista. Obrigada por todo o esforço, apoio, confiança e amor que sempre me deram. Tudo o que sou e serei, agradecer-lhes-ei eternamente. Como sempre lhes digo, eles são os melhores do mundo e sou uma sortuda por os ter como pais.

Agradecer, também, a toda a minha família por todo o carinho, força, apoio e presença em todos os momentos da minha vida.

Um agradecimento do tamanho do mundo ao meu namorado que é sempre o meu braço direito, o meu pilar, a minha força, o meu sorriso...o meu tudo. Aquele que faz todos os esforços para me ver feliz e realizada. Continuaremos a remar juntos em direção aos nossos sonhos.

Resumo

A *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica e em forma de bastonete. Esta bactéria produz muitos fatores de virulência, dos quais os principais incluem o lipopolissacárido (LPS), cápsula polissacarídica, pilis comuns e proteases.

P. gingivalis é um dos principais agentes etiológicos da periodontite, verificando-se a sua presença em cerca de 85% dos casos. Mesmo em baixa quantidade a *P. gingivalis* tem a capacidade de provocar periodontite crónica através da remodelação da comunidade bacteriana comensal, de modo a promover um estado de disbiose que predispõe à doença.

Esta bactéria tem sido associada com inúmeras doenças sistémicas e orais, como por exemplo a diabetes, cancro, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e problemas na gravidez.

O principal objetivo desta dissertação foi rever de forma crítica e caracterizar o papel da bactéria *P. gingivalis* na etiologia das doenças orais e sistémicas. A pesquisa foi realizada, essencialmente, através da base de dados PubMed e foram incluídas publicações no intervalo de 2018-2022. Palavras-chaves como “systemic diseases”, “oral diseases” e “*Porphyromonas gingivalis*” foram utilizadas aquando da realização da pesquisa bibliográfica.

Desta dissertação, conclui-se que a *P.gingivalis* devido aos seus fatores de virulência tem a capacidade de alterar algumas das funções do sistema imunológico e ser um fator patogénico para algumas doenças, tais como artrite reumatoide, aterosclerose, etc.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*, doenças orais, doenças sistémicas, LPS

Abstract

Porphyromonas gingivalis is a Gram-negative, anaerobic, rod-shaped bacterium. This bacterium produces many virulence factors, the main ones of which include lipopolysaccharide (LPS), a polysaccharide capsule, common pilis and proteases.

P.gingivalis is one of the main etiological agents of periodontitis, with its presence in about 85% of cases. Even in low amounts, *P.gingivalis* has the ability to cause chronic periodontitis through the remodeling of the comensal bacterial community, in order to promote a state of dysbiosis that predisposes to the disease.

This bacterium has been correlated with numerous systemic and oral diseases, such as diabetes, cancer, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases and pregnancy problems.

The main objective of this dissertation is to critically review and characterize the role of the bacterium *P.gingivalis* in the etiology of oral and systemic diseases. The search was essentially carried out through the PubMed database and publications in the 2018-2022 range were included. Keywords such as "sistemic diseases", "oral diseases" and "*Porphyromonas gingivalis*" were used during the literature search.

From this dissertation it is concluded that *P.gingivalis*, due to its virulence factors, has the ability to alter the functions of the immune system and be a pathogenic factor for some diseases, such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis, etc.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, oral diseases, systemic diseases, LPS

ÍNDICE

I. Introdução.....	15
II. Materiais e Métodos	19
1. Protocolo.....	19
2. Pergunta de investigação e critérios de inclusão	19
3. Estratégia de pesquisa e seleção de Estudos.....	19
III. Resultados	21
1. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	21
1.1 Taxonomia e Características da bactéria	21
1.2 Presença da <i>P.gingivalis</i> no corpo humano	23
1.2.1 Colonização da <i>Porphyromonas gingivalis</i> na cavidade oral.....	26
1.2.2 Outros locais de colonização da <i>P.gingivalis</i> no corpo humano	29
1.3 Fatores de Virulência.....	29
1.3.1 Lipopolissacárido (LPS)	31
1.3.2 Cápsula	34
1.3.3 <i>Pilis</i> Comuns	35
1.3.4 Proteases	36
1.3.5 Outros	38
2. Doenças orais e sistêmicas causadas pela <i>Porphyromonas gingivalis</i>	41
2.1. Periodontite.....	41
2.1.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com a periodontite	43
2.2 Doença de Alzheimer.....	46
2.2.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com a Doença de Alzheimer's.....	46
2.3 Carcinoma de células escamosas na cavidade oral	50
2.3.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com o carcinoma de células escamosas na cavidade oral	50
2.4 Diabetes mellitus	52
2.4.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com a diabetes.....	53
2.5 Artrite reumatoide.....	54
2.5.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com a artrite reumatoide	54
2.6 Aterosclerose	56
2.6.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com a aterosclerose.....	56
2.7 Esteatose Hepática Não Alcoólica (EHNA).....	59
2.7.1 Relação da <i>P.gingivalis</i> com a EHNA.....	59
2.8 Problemas na gravidez.....	60

2.8.1	Relação da <i>P.gingivalis</i> com problemas na gravidez	60
IV.	Conclusão	63
V.	Bibliografia.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diversidade de espécies existentes na cavidade oral. O biofilme dentário é composto por dois tipos de colonizadores que podem ser Gram-positivos, Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios: colonizadores primários (como por exemplo, <i>Streptococcus oralis</i>) e colonizadores secundários (como por exemplo, <i>Prevotella intermedia</i>) [adaptado de (Mohanty et al., 2019)]	16
Figura 2 - Esquematização dos seis grupos de espécies microbianas que constituem os complexos microbianos subgengivais. A amarelo, azul e verde estão representados os colonizadores primários, que há medida que se vão desenvolvendo, levam à multiplicação de espécies dos complexos laranja e vermelho que compreendem as principais bactérias patogénicas da doença periodontal [adaptado de (Mohanty et al., 2019)]	17
Figura 3 - Estrutura anatómica de um peridoto saudável. Legendas: D- dente, SG – sulco gengival, EJ- Epitélio juncional, CR- cemento radicular, LP- ligamento periodontal, TC – tecido conjuntivo, G-gengiva [adaptado de (Könönen et al., 2019)]	18
Figura 4 - Colónias negras de <i>P.gingivalis</i> em meio de cultura agar-sangue (A); Microscopia Eletrónica da <i>P.gingivalis</i> (formação do biofilme) (B) [adaptado de (Imai & Ogata, 2020; Stoberneck, 2019)]	22
Figura 5 - A perda da homeostase microbiana oral e a inflamação resultante levam ao recrutamento de células imunes inatas para os tecidos periodontais. Presença da <i>P.gingivalis</i> como principal agente patogénico nas bolsas periodontais [adaptado de (Stoberneck, 2019)]	22
Figura 6 – Fases do desenvolvimento da doença periodontal. Após a acumulação de placa dentária, os neutrófilos dominam a resposta imune do hospedeiro e ocorre a progressão da gengivite precoce, ao mesmo tempo, que ocorre um aumento da infiltração de macrófagos e células T. A gengivite evolui para periodontite, que se caracteriza pela formação de uma bolsa periodontal com posterior destruição dos tecidos periodontais [adaptado de (Kriebel et al., 2018)]	26
Figura 7 - Disbiose microbiana induzida pela <i>P.gingivalis</i> . A <i>P.gingivalis</i> subverte o sistema do complemento, comprometendo a defesa do hospedeiro, ao mesmo tempo que aumenta a inflamação. Estes processos originam uma disbiose da microbiota oral. Estas mudanças ambientais favorecem a bactéria <i>P.gingivalis</i> e outras bactérias proteolíticas e sacarolíticas. Além disto, a perda óssea proporciona novos nichos para a colonização pela microbiota disbiótica. Estas mudanças tornam-se num ciclo “autossustentável” no qual a inflamação e a disbiose são agravadas reciprocamente [adaptado de (Hajishengallis & Diaz, 2020)]	27
Figura 8 - Representação esquemática de células da <i>P.gingivalis</i> . A célula é circundada por uma camada superficial eletrodensa (EDSL) onde estão presentes as gingipaínas na superfície celular e a cápsula. Outros fatores de virulência incluem as fímbrias e	

vesículas da membrana externa. Os sistemas de aquisição de ferro e di e tri peptídeos que servem como fontes de carbono são mecanismos de aquisição de elementos essenciais. [adaptado de (Lunar Silva & Cascales, 2021)]..... 30

Figura 9 - Estrutura do LPS. O LPS é composto pelo lípido A, polissacárido central e antígeno O [adaptado de (Jia et al., 2019)]..... 32

Figura 10 - Ilustração esquemática das vias de sinalização do recetor TLR4. O reconhecimento do LPS ativa vias dependentes de MyD88 e vias dependentes de TRIF. Na via dependente de MyD88, o recrutamento de MyD88 por TIRAP inicia a interação de IRAK e TRAF6, que desencadeia a ativação de fatores de transcrição. A endocitose de TLR4 inicia a sinalização dependente de TRIF que envolve o recrutamento de TRAM e TRIF que levam à indução de subseqüente de TBK1 e IKKε, bem como à ativação do fator de transcrição IRF3 [adaptado de (Molteni et al., 2018)] 34

Figura 11 - Estrutura das gingipaínas. As gingipaínas são divididas em Rgp e Kgp. O Rgp é ainda subdividido em RgpA e RgpB. As gingipaínas são compostas por: péptido, domínio N-terminal, domínio da superfamília da imunoglobulina (IgsF), domínio hemaglutinina/adesão (HA) e o domínio C-terminal. A estrutura de RgpB é a mais simples, pois não contém o domínio HA. RgpA contém 4 domínios HA (denominados RgpA A1 a RgpA A4). O Kgp possui entre 3-5 domínios HA (denominados de KgpA A1 a KgpA A5) [adaptado de (Jia et al., 2019)]..... 37

Figura 12 - Esquematização do Sistema CRISPR-Cas. (a) - adaptação: os bacteriófagos entram nas células, pequenos fragmentos de DNAs exógenos (invasores) são incorporados como novos espaçadores no locus CRISPR; (b) – expressão: o CrRNA é produzido através do locus CRISPR e, posteriormente, processos em crRNAs maduros; (c)-interferência [adaptado de (Gong et al., 2020)] 40

Figura 13 - Esquematização das etapas do desenvolvimento do biofilme [adaptado de (Rath et al., 2021)]..... 42

Figura 14 - Prevalência global da doença periodontal em comparação com a diabetes, hipertensão, depressão e asma [adaptado de (Kwon et al., 2021)]..... 43

Figura 15 - Mecanismo molecular da formação e ativação dos osteoclastos pela *P.gingivalis*. A *P.gingivalis* promove a osteoclastogênese direta e indiretamente via indução do sistema imunológico [adaptado de (Usui et al., 2021)] 45

Figura 16 - Relação entre a periodontite e a doença de Alzheimer's. A *P.gingivalis* tem a capacidade de entrar na corrente sanguínea durante uma bacteremia transitória e obter acesso ao cérebro por diversas vias, incluindo através da barreira hematoencefálica. Esta invasão microbiana, tem como consequência a ocorrência de neuro inflamação com posterior neuro degeneração e déficit cognitivo. As placas senis presentes na doença de Alzheimer são depósitos da proteína beta-amiloide, Ambas as doenças partilham alguns fatores de risco o que sugere que haja uma relação causal entre ambas. [adaptado de (Kanasingam et al., 2020)]..... 49

Figura 17 - Cascatas moleculares ativadas por *P.gingivalis* em células endoteliais. O recetor TLR medeia o reconhecimento de *P.gingivalis*. A *P.gingivalis* promove o stress oxidativo, através de TLRs–NF- κ B e inflamassomas NLRP3. A *P.gingivalis* induz a apoptose de células endoteliais através da ativação das caspases 3, 8 e 9, sendo que as suas gingipaínas também podem induzir a apoptose das células endoteliais através da indução da clivagem de PARP e topo I. O LPS da *P.gingivalis* promove a transição do epitélio mesenquimal através da regulação de p38, Erk1/2. *P.gingivalis* aumenta a migração de monócitos com uma expressão aumentada de MCP-1, ICAM-1, IL-8, P-selectina, E-selectina em células endoteliais [adaptado de (Zhang et al., 2021)]..... 58

Figura 18 - Interação da *P.gingivalis* com diversos recetores nos tecidos maternos e fetais. A *P.gingivalis* interage com vários recetores nos tecidos maternos e fetais, de modo a exacerbar uma resposta inflamatória: o LPS desta bactéria liga-se ao recetor TLR, recetores do sistema do complemento, domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos (NOD) nos tecidos maternos e fetais. O aumento da infiltração dos neutrófilos lesa o tecido conjuntivo do compartimento uterino, libertando MMPs e ocorrendo a fagocitose induzida por neutrófilos. O aumento da concentração de MMP juntamente com a ativação dos recetores TLR2/4 induzem o influxo de cálcio para os miócitos do tecido conjuntivo uterino e reduzem o comprimento cervical. O comprimento cervical reduzido está relacionado com um risco aumentado de trabalho de parto prematuro, restrição no crescimento fetal, aborto recorrente, infertilidade e falha na implantação [adaptado de (Chopra et al., 2020)] 62

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios Picos.....	19
---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – Artrite Reumatoide

CDs – Células Dendríticas

CMLV – Células Musculares Lisas Vasculares

DA- Doença de Alzheimer

DDP4 - Dipeptidil Peptidase-4

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EHNA – Esteatose Hepática Não Alcoólica

FDA - Food and Drug Administration

FCG – Fluxo Crevicular Gengival

GSK – Glicogénio Sintase Cinase

HSCs – Células Estreladas Hepáticas

Ig- Inumoglobulina

IL – Interleucina

LBP – Proteína de ligação ao LPS

LPS- Lipopolissacárido

MAPK – Proteína cinase mitogénica

MMPs – Metaloproteinases da Matriz

NK – Natural Killer

PAMP- Padrão Molecular associado ao Patógeno

PPADs - Peptidilarginina Deiminases

PRRs – Padrões de Reconhecimento de Padrões

RANKL – Recetor Ativador do Recetor Nuclear KB

ROS – Espécies Reativas ao Oxigénio

TLR – Recetor Toll-like

TNF – Fator de Necrose Tumoral

ZEB1 – Zinc finger E-box-binding homeobox 1

I. Introdução

A cavidade oral contém um conjunto complexo de microrganismos, genericamente denominados de microbiota oral, desenvolvido logo após os primeiros minutos de vida de uma criança e é a segunda microbiota com mais diversidade de espécies, sendo composta por mais de 700 espécies de bactérias, protozoários, fungos, *archae* (grupo de seres vivos unicelulares morfológicamente idênticos às bactérias), bacteriófagos e *candidate phyla radiation group* (uma radiação evolutiva de linhagens bacterianas em que a maior parte dos seus membros não são cultiváveis e, somente, são conhecidos por análise genômica e sequenciamento de célula única (Figura 1). A cavidade oral é um ambiente com uma grande complexidade onde cada superfície dispõe de um nicho ecológico único com os seus nutrientes, condições ambientais adequando-se, apenas, para um certo número de microrganismos e onde estes colonizam em diferentes habitats. Embora cada indivíduo tenha a sua “identidade microbiana”, pois esta depende de alguns fatores, tais como idade, dieta, hábitos tabágicos e atividade física, a função da microbiota é a mesma em todos os indivíduos, apresentando um papel crucial na saúde e no desenvolvimento dos mesmos. (Caselli et al., 2020; Mohanty et al., 2019).

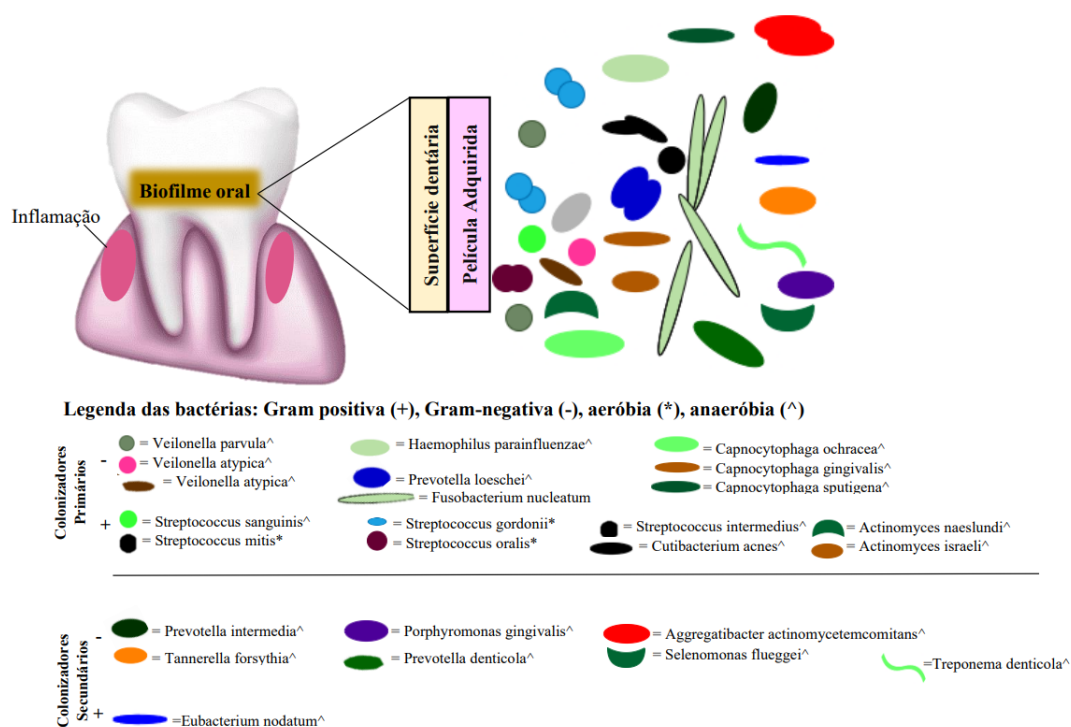


Figura 1 - Diversidade de espécies existentes na cavidade oral. O biofilme dentário é composto por dois tipos de colonizadores que podem ser Gram-positivos, Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios: colonizadores primários (como por exemplo, *Streptococcus oralis*) e colonizadores secundários (como por exemplo, *Prevotella intermedia*) [adaptado de (Mohanty et al., 2019)]

As bactérias da microbiota oral presentes num estado de saúde coabitam com o ser humano num estado de simbiose. Existem dois estados de equilíbrio:

- Entre a proliferação de diferentes espécies;
- Entre as próprias bactérias.

Caso ocorra um desequilíbrio na homeostase, denominado por disbiose, um ou mais tipo de microrganismos proliferam e ativam as funções defensivas do sistema imunitário. A disbiose oral causa um estado inflamatório na cavidade oral que contribui para a inflamação crónica sistémica de baixo grau. Este facto pode levar ao desenvolvimento ou agravamento de patologias sistémicas. Deste modo, a microbiota oral torna-se num marcador de saúde geral através da sua atividade sistémica (Mohanty et al., 2019).

A cavidade oral de indivíduos saudáveis é composta por uma microbiota comensal, sendo o *Streptococcus* o género bacteriano mais abundante e prevalente em locais não afetados por doenças periodontais (Ślęzak et al., 2020). Entre os diversos complexos

microbianos, o complexo laranja é o primeiro a ser relacionado com a doença periodontal sendo constituído por bactérias anaeróbias Gram negativas como a *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella micros* e *Fusobacterium nucleatum*. À medida que a doença vai progredindo passa-se do complexo laranja para o vermelho constituído pelas *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. As bactérias comensais com baixa patogenicidade como por exemplo, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena* e *Eikenella corrodens* estão incluídas nos complexos verde e amarelo (Figura 2). As bactérias destes dois complexos não estão diretamente envolvidas no desenvolvimento de doença periodontal, mas estão envolvidas no estabelecimento dos complexos vermelho e laranja (Caselli et al., 2020; Mohanty et al., 2019).

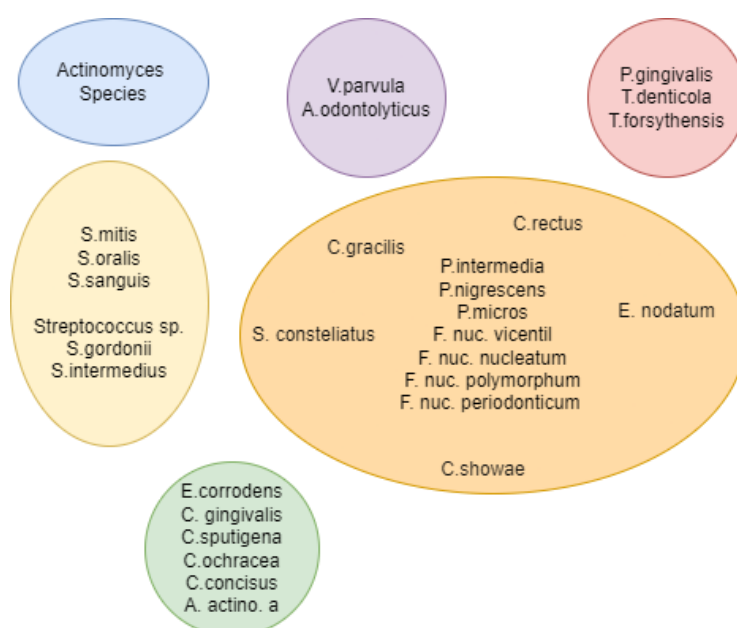


Figura 2 - Esquematização dos seis grupos de espécies microbianas que constituem os complexos microbianos subgingivais. A amarelo, azul e verde estão representados os colonizadores primários, que há medida que se vão desenvolvendo, levam à multiplicação de espécies dos complexos laranja e vermelho que compreendem as principais bactérias patogénicas da doença periodontal [adaptado de (Mohanty et al., 2019)]

A periodontite é uma doença inflamatória oral em que uma resposta imunitária excessiva direcionada à microbiota na superfície do dente destrói os tecidos que suportam os dentes, ou seja, o periodonto, formando bolsas periodontais. A microbiota destas bolsas inclui bactérias patogénicas anaeróbias que formam biofilmes e que são microrganismos muito resistentes aos antibacterianos e componentes imunitários do sistema imunitário do hospedeiro (Isoshima et al., 2020).

Fatores como a genética, fatores ambientais e comportamentais estão também associados ao desenvolvimento da doença periodontal. A estrutura do periodonto é complexa sendo composta por gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Figura 3). O epitélio juncional é uma estrutura localizada no fundo do sulco gengival e que controla a presença de bactérias (Isoshima et al., 2020).

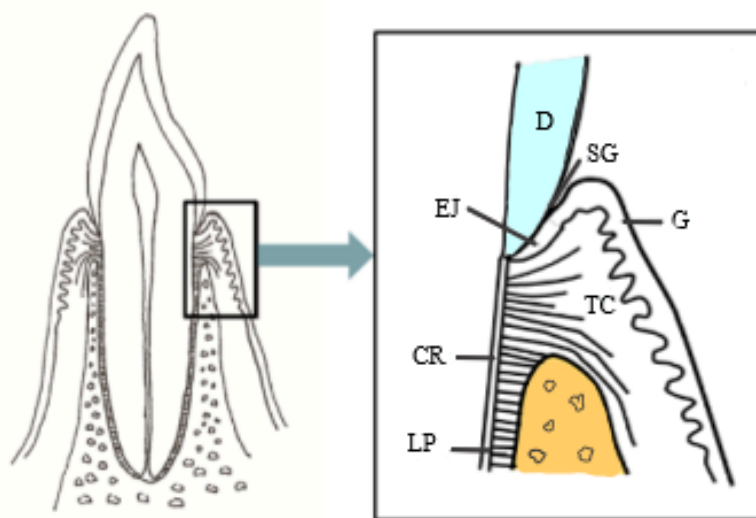


Figura 3 - Estrutura anatômica de um periodonto saudável. Legendas: D- dente, SG – sulco gengival, EJ- Epitélio juncional, CR- cemento radicular, LP- ligamento periodontal, TC – tecido conjuntivo, G-gengiva [adaptado de (Könönen et al., 2019)]

Este trabalho teve como principal objetivo rever de forma crítica e caracterizar o papel de uma bactéria presente na cavidade oral, denominada de *Porphyromonas gingivalis*, na etiologia de doenças tanto orais como sistêmicas

II. Materiais e Métodos

1. Protocolo

Esta revisão sistemática utilizou as diretrizes PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis) (Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G.; Group, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. PLoS Med. 2009, 6, e1000097). A lista de verificação PRISMA está disponível como informação suplementar (Tabela 1).

2. Pergunta de investigação e critérios de inclusão

Foi colocada a seguinte questão: “Qual a evidência científica de que a bactéria *Porphyromonas gingivalis* causa doenças sistêmicas e orais? Os critérios PICOS que permitiram a elaboração da pergunta de investigação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios Picos

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

P	População ou Problema	Pacientes com doenças sistêmicas e orais, qualquer idade e sem restrição de sexo.
I	Intervenção ou exposição	Infeção com <i>P. gingivalis</i>
C	Comparação	Indivíduos saudáveis não infetados por <i>P. gingivalis</i>
O	Resultados	Tipo de doença oral e/ou sistêmica associada à <i>P. gingivalis</i>
S	Desenho do estudo	Estudos primários e ensaios clínicos

- Estudos que tenham sido realizados em amostras constituídas por pessoas de qualquer idade e de ambos os sexos;
- Estudos nos quais a bactéria *Porphyromonas gingivalis* tenha sido avaliada como causadora ou influenciadora de doenças sistêmicas ou orais;
- Estudos completos escritos em inglês;
- Estudos realizados nos últimos 3 anos.

3. Estratégia de pesquisa e seleção de Estudos

A pesquisa foi realizada na base de dados electrónica PubMed utilizando as palavras-chave “systemic diseases”, “oral diseases” e “*Porphyromonas gingivalis*” e a conjugação

destas palavras-chave. Foram selecionados os artigos em língua inglesa publicados entre 1 de janeiro de 2018 e 31 de agosto de 2022. Pesquisas adicionais foram realizadas após a leitura das referências de todos os artigos relevantes. Os textos completos de todos os artigos correspondentes aos critérios de inclusão foram obtidos e examinados para inclusão final. O processo de seleção foi incluído num diagrama de fluxo PRISMA.

III. Resultados

Para a realização desta dissertação foram pesquisados e lidos 196 artigos, no entanto apenas foram selecionados 147 artigos pois eram estes que apresentam os critérios estabelecidos no capítulo II. Destes 147, apenas 91 se apresentaram essenciais para a realização da tese.

1. *Porphyromonas gingivalis*

1.1 Taxonomia e Características da bactéria

A taxonomia da bactéria *Porphyromonas gingivalis* pode ilustrar-se da seguinte forma segundo a *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2016):

- Reino: *Bacteria*
- Filo: *Bacteroidetes*
- Classe: *Bacteroidia*
- Ordem: *Bacteroidales*
- Família: *Porphyromonadaceae*
- Género: *Porphyromonas*
- Espécie: *Porphyromonas gingivalis*

A *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria anaeróbica Gram-negativa, em forma de bastonete, que forma colónias negras em meios de cultura agar-sangue (Figura 4) e que necessita da presença de grupos heme e vitamina K no seu ambiente de crescimento (Maquera-Huacho et al., 2022; Mei et al., 2020).

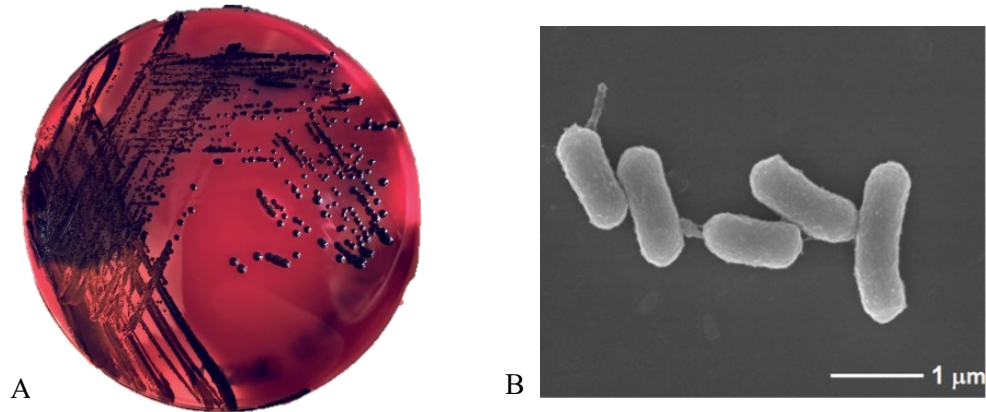


Figura 4 - Colônias negras de *P. gingivalis* em meio de cultura agar-sangue (A); Microscopia Eletrônica da *P. gingivalis* (formação do biofilme) (B) [adaptado de (Imai & Ogata, 2020; Stoberneck, 2019)]

Como mencionado anteriormente, a *P. gingivalis* coloniza o epitélio oral, faz parte do microbioma subgengival, e é um dos agentes etiológicos da doença periodontal, estando associada à hemorragia gengival, aumento da profundidade de bolsas periodontais e da reabsorção óssea (Maquera-Huacho et al., 2022). Esta bactéria devido aos seus fatores de virulência tem a capacidade de modificar a atividade do sistema imunitário e invadir células epiteliais e endoteliais orais induzindo citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de monócitos, neutrófilos e macrófagos (Figura 5). É também capaz de remodelar a comunidade bacteriana comensal da boca, de modo a promover um estado de disbiose (Mei et al., 2020; Radhakrishnan et al., 2019).

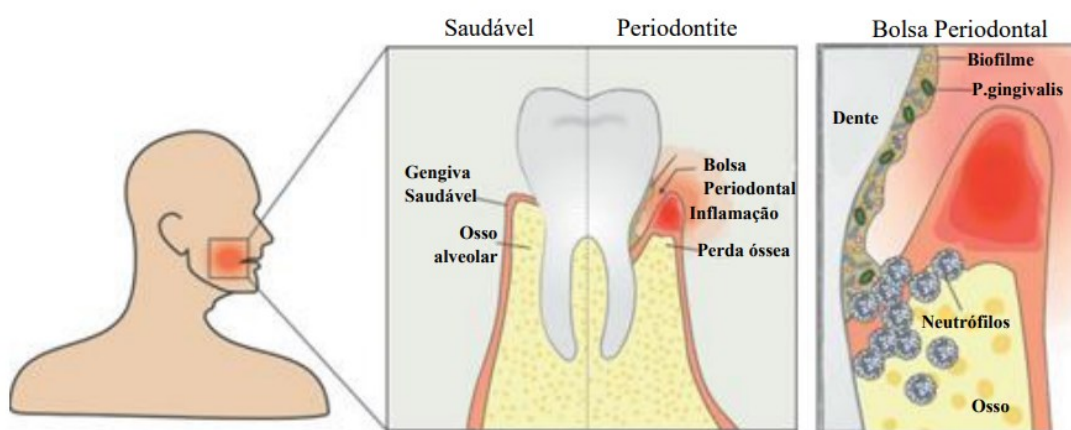


Figura 5 - A perda da homeostase microbiana oral e a inflamação resultante levam ao recrutamento de células imunes inatas para os tecidos periodontais. Presença da *P. gingivalis* como principal agente patogénico nas bolsas periodontais [adaptado de (Stoberneck, 2019)]

Esta bactéria tem componentes que promovem a alteração das vias de sinalização da inflamação, do ciclo celular, do sistema de complemento e da apoptose. Também pode promover ou alterar a interação entre os diversos recetores do hospedeiro que posteriormente modificam o seu ambiente/resposta imunitária do mesmo, de modo a modular o ecossistema e permitir a sobrevivência da *P.gingivalis* nos tecidos do hospedeiro. Todas estas estratégias de sobrevivência da *P.gingivalis* estão dependentes dos seus fatores de virulência, que serão abordados no subcapítulo 1.3, e dos seus componentes estruturais (lipopolissacárido, fimbrias, proteínas de choque térmico, etc.) e secretórios tais como as gingipaínas e vesículas exteriores da membrana (Mei et al., 2020).

1.2 Presença da *P.gingivalis* no corpo humano

A cavidade oral faz parte do aparelho digestivo e como tal inclui inúmeros microrganismos, sendo a microbiota oral composta por uma comunidade microbiana de grande complexidade (Lamont et al., 2018; Zhang et al., 2020).

A microbiota oral exerce um papel de elevada importância no contexto geral da saúde humana e a sua disbiose pode ter como consequências o desenvolvimento de doenças orais e sistémicas (Olsen & Yamazaki, 2019; Zhang et al., 2020).

A placa dentária tem uma composição muito elaborada, sendo composta por partículas de alimentos, bactérias, produtos residuais de bactérias tanto na superfície do dente como noutras superfícies da cavidade oral. A acumulação de bactérias provoca patologias como gengivite, periodontite e cáries (Yan et al., 2021).

A *Porphyromonas gingivalis* é uma das bactérias mais fulcrais na formação do biofilme e desempenha um importante papel no desenvolvimento da doença periodontal. A *P.gingivalis* tem a capacidade de produzir collagenase, proteases, hemolisinas, endotoxinas, gorduras, ácidos, amoníaco, sulfureto de hidrogénio, indole, entre outros. Para além disso, esta bactéria inibe a migração de polimorfonucleares através da barreira endotelial. A *P.gingivalis* está presente nos doentes com doença periodontal, no entanto, encontra-se em maiores quantidades em pacientes que têm uma doença periodontal mais agressiva.

Após se realizar ações do cotidiano como por exemplo comer, ocorre a deposição de biofilme nas superfícies dentárias. Os primeiros colonizadores são *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*; *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus oralis*; e *Streptococcus sanguis* (Fiorollo et al., 2019). Posteriormente, ocorre a agregação bacteriana onde se encontra a *Fusobacterium nucleatum* que assegura, diretamente ou através da bactéria *Treponema denticola*, a subsequente adesão da *Porphyromonas gingivalis* que é designado como um colonizador tardio, assim como a *Actinomyces actinomycetemcomitans* ou a *Prevotella intermedia* (Fiorollo et al., 2019).

A *P.gingivalis*, como referido anteriormente, é uma bactéria anaeróbia o que a torna pouco provável de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, desta forma o seu meio de transmissão mais presumível é a propagação de pessoa para pessoa, sendo a saliva contaminada um dos fatores mais relevantes para esta propagação (Kriebel et al., 2018).

Num estudo realizado por Rafiei et al (2018), em pacientes com periodontite e pacientes saudáveis, a prevalência de *P.gingivalis* no grupo de pacientes com doença periodontal foi de 78% e no grupo de pacientes em saúde oral foi de 34%. Também se verificou que a prevalência desta bactéria é maior em bolsas periodontais mais profundas.

De realçar que fatores como a idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, entre outros são muito importantes na prevalência desta bactéria, uma vez que podem afetar a capacidade da invasão da mesma nos tecidos periodontais e do posterior desenvolvimento da doença periodontal (Rafiei et al., 2018). A *P.gingivalis* é um dos fatores mais cruciais para o desenvolvimento da periodontite crónica que afeta, aproximadamente, **50% da população mundial** (Mei et al., 2020).

Num periodonto saudável, a resposta imunitária da mucosa e a infiltração de células imunitárias desencadeadas por agentes patogénicos periodontais no biofilme dentário têm papéis moderados e protetores. Os macrófagos e monócitos, principalmente, desempenham um papel primordial nas defesas do hospedeiro contra infeções periodontais, contribuindo para o início de uma resposta imunitária adaptativa. Porém, se os agentes patogénicos periodontais proliferarem e aumentarem de número, irá ocorrer um estado de disbiose nos locais mais subgengivais tendo como consequência uma resposta inflamatória exacerbada, levando à secreção de citocinas e metaloproteínases da

matriz (MMPs) que contribuem para as reações inflamatórias crônicas, modulação do tecido conjuntivo e destruição óssea (Maquera-Huacho et al., 2022).

O estabelecimento e amadurecimento dos biofilmes dentários são definidos pela co- agregação de agentes patogénicos oportunistas causados por diversos fatores, como por exemplo a deficiente higiene oral do indivíduo. O biofilme maduro causa uma progressão mais acelerada da periodontite devido à existência de uma inflamação mais prolongada associada à resposta imunitária. Deste modo, a periodontite pode classificar-se como uma doença infecciosa causada pelo desequilíbrio do microbioma oral e como uma doença inflamatória causada por uma resposta imunitária desregulada. A infeção das células periodontais do hospedeiro, assim como a expressão dos fatores de virulência, podem provocar uma resposta inflamatória local. A inflamação inicial dos tecidos periodontais é denominada de gengivite e pode ser resolvida através da remoção dos biofilmes dentários (Kriebel et al., 2018; Isoshima et al., 2021).

A periodontite por sua vez, é caracterizada por processos irreversíveis e progressivos, levando à degradação dos tecidos periodontais. Devido à continua inflamação, proliferação das células epiteliais de ligação das superfícies dentárias e tecidos gengivais ocorre o desprendimento da camada celular e posterior formação de bolsas periodontais (Figura 6) (Kriebel et al., 2018).

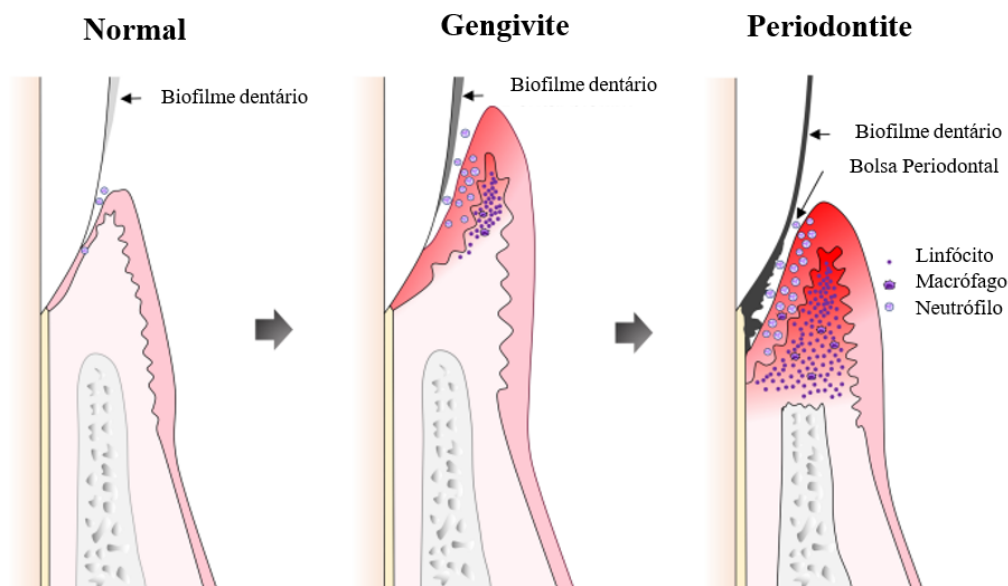


Figura 6 – Fases do desenvolvimento da doença periodontal. Após a acumulação de placa dentária, os neutrófilos dominam a resposta imune do hospedeiro e ocorre a progressão da gengivite precoce, ao mesmo tempo, que ocorre um aumento da infiltração de macrófagos e células T. A gengivite evolui para periodontite, que se caracteriza pela formação de uma bolsa periodontal com posterior destruição dos tecidos periodontais [adaptado de (Kriebel et al., 2018)]

1.2.1 Colonização da *Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral

A *P.gingivalis* subverte o sistema do complemento comprometendo a defesa antimicrobiana, aumentando a inflamação. O sistema do complemento é ativado através de cascatas proteolíticas e desempenha um papel vital nas atividades inatas e adaptativas do hospedeiro. O complemento apresenta três papéis principais que são a opsonização, quimiotaxia e lise de células infectadas. O complemento opsoniza as bactérias depositando componentes de ativação do complemento nas superfícies bacterianas para ligar os receptores do complemento dos fagócitos, promovendo o reconhecimento e a fagocitose das bactérias pelos fagócitos. Os componentes C4a, C5a, C3a e C5b67 são quimiocinas de neutrófilos e macrófagos que mediam a quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos para o local da inflamação (Zheng et al., 2020). A *P. gingivalis* através do seu fator de virulência gingipaína tem a capacidade de clivar C3 em C3a e C3b, o que impede a formação de C5 convertase (Zheng et al., 2020). A deposição de C3b na superfície bacteriana promove a opsonização das bactérias e a sua posterior eliminação. Assim, a degradação do C3b pelas gingipaínas impede a eliminação da *P.gingivalis* do hospedeiro.

Além disto, as gingipaínas têm a capacidade de clivar o C5 em fragmento de C5a e C5b e de clivar, ainda mais, o C5b, o que impede a formação do complexo de ataque à membrana (Zheng et al., 2020). As gingipaínas da *P.gingivalis* têm um efeito dose-dependente, ou seja, em baixas concentrações não bloqueiam a ativação do sistema do complemento, mas em altas concentrações os componentes C3b e C5b são degradados e a formação de C3 e C5 é impedida, o que impede a reação em cascata do complemento (Zheng et al., 2020).

A capacidade da *P.gingivalis* em manipular o sistema do hospedeiro beneficia toda a comunidade microbiana, que se torna disbiótica e que, conseqüentemente, leva ao desenvolvimento da doença periodontal causando perda óssea (Figura 7) (Hajishengallis & Diaz, 2020).

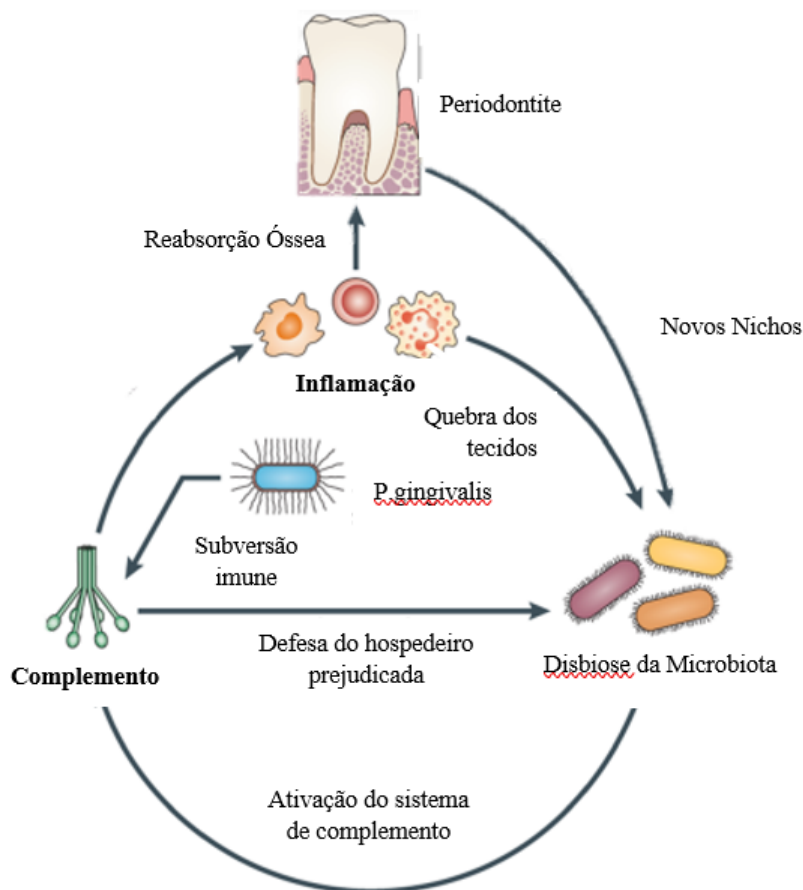


Figura 7 - Disbiose microbiana induzida pela *P.gingivalis*. A *P.gingivalis* subverte o sistema do complemento, comprometendo a defesa do hospedeiro, ao mesmo tempo que aumenta a inflamação. Estes processos originam uma disbiose da microbiota oral. Estas mudanças ambientais favorecem a bactéria *P.gingivalis* e outras bactérias proteolíticas e sacarolíticas. Além disto, a perda óssea proporciona novos nichos para a colonização pela microbiota disbiótica. Estas mudanças tornam-se num ciclo “autossustentável” no qual a inflamação e a disbiose são agravadas reciprocamente [adaptado de (Hajishengallis & Diaz, 2020)]

A *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria sacarolítica gerando a sua energia metabólica por intermédio da fermentação de aminoácidos (Lunar Silva & Cascales, 2021). Este processo é decisivo na sobrevivência nas bolsas periodontais profundas, onde os açúcares são muito escassos. De modo a aceder aos aminoácidos e péptidos, a *P.gingivalis* segrega uma enorme variedade de proteases que degradam as proteínas exógenas para gerar péptidos que entram no periplasma onde são fragmentados em di ou tri- péptidos, antes de serem transportados para o citoplasma através de transportadores oligopeptídicos. A *P.gingivalis* de entre as bactérias patogénicas orais é a única capaz de aceitar heme à superfície da célula (protoporfirina de ferro IX [FePPIX]), contendo o pigmento 1-oxo-bisheme ([FePPIX]₂O quando cultivada em meios que contêm sangue, gerando uma pigmentação escura (Lunar Silva & Cascales, 2021). Este heme é obtido mediante a degradação das proteínas do hospedeiro, nomeadamente da hemoglobina, por um *cocktail* de proteases específicas de lisina e arginina, denominadas de gingipaínas (Lunar Silva & Cascales, 2021).

A *P. gingivalis* é uma das três bactérias do chamado “complexo vermelho”. A presença deste complexo está relacionada com lesões periodontais mais agressivas como o aumento da profundidade das bolsas periodontais e hemorragia. Dentro deste complexo a *P.gingivalis* atua como principal agente patogénico contribuindo para o desequilíbrio microbiano tendo como consequência a progressão da doença. Ainda inseridas neste complexo temos duas bactérias denominadas de *T. denticola* e *T. forsythia* que contribuem para a simbiocidade da comunidade microbiana após a hemostasia estar alterada, atuando, assim, como fatores patogénicos que aceleram a progressão da doença. Além do mais, as fimbrias da *P.gingivalis* mediam a *coagregação* da mesma com outros agentes patogénicos como a *T. denticola*, *Streptococcus oralis* ou *S.gordonii*, levando ao desenvolvimento da gengivite (Kadota et al., 2020; Lunar & Cascales, 2021).

A *P. gingivalis*, primeiramente, pode ser encontrada numa comunidade com espécies bacterianas variadas que residem na bolsa subgengival. No entanto, a sua primeira ação na cavidade oral é a colonização da placa supragengival interagindo com *Streptococcus* orais (Tan et al., 2018). Esta interação da *P.gingivalis* com os *Streptococcus* orais tem uma importância relevante no processo inicial da colonização. A adesão da *P.gingivalis* aos *Streptococcus* orais é específica e é estimulada por uma interação proteína-proteína que ocorre entre o *Fimbria* minor (Mfa1) da *P.gingivalis* e o antígeno I/II (Ag I/II) do *Streptococcus* (Jung et al., 2019; Roky et al., 2020).

1.2.2 Outros locais de colonização da *P. gingivalis* no corpo humano

A *Porphyromonas gingivalis* é uma das bactérias patogénicas mais comuns da doença periodontal. Contém vários fatores de virulência que estimulam a libertação de enzimas derivadas de tecidos (por exemplo, collagenase e protease) e metaloproteinases da matriz, que destroem os tecidos conjuntivos e o osso alveolar. A *P.gingivalis* pode contribuir para a patogénese de inúmeras doenças sistémicas como a diabetes, doença cardiovascular, artrite reumatoide, doença de alzheimer, entre outras (Sugiyama et al., 2022).

A colonização pela *P. gingivalis* promove a inflamação e leva a uma defesa deficiente por parte do hospedeiro. As alterações causadas pela *P. gingivalis*, como por exemplo, a libertação das enzimas (exemplo, proteases) e das metaloproteinases da matriz, ocasionam inflamações e alterações na composição da microbiota subgingival, resultando em disbiose. A destruição dos tecidos resultante da inflamação, aumenta o fluxo crevicular gengival (FCG), o que leva a que o colagénio e os compostos que contêm heme (por exemplo, hemoglobina) entrem no sulco gengival. Estas moléculas são utilizadas por outras bactérias (*T. denticola*, *S. gordonii*, etc), desenvolvendo mais desequilíbrio nas comunidades microbianas do sulco gengival. No entanto, as espécies bacterianas comensais estão em desvantagem nesta condição ambiental, pois as novas moléculas em circulação não são essenciais para o seu desenvolvimento, mas sim para o desenvolvimento das bactérias patogénicas, agravando a disbiose o que agudiza a inflamação, resultando em periodontite. A *P.gingivalis* pode ser encontrada noutros locais, tais como o líquido sinovial e plasma, o que sugere a sua potencial correlação com as diversas doenças sistémicas (Zhang et al., 2021).

1.3 Fatores de Virulência

A *Porphyromonas gingivalis* tem a capacidade de produzir uma grande variedade de fatores de virulência como as **proteases extracelulares**, **lipopolissacárido (LPS)**, **material capsular**, ***pilis* comuns** (ou **fimbrias**), **recetores de superfícies**,

hematoglutininina e um sistema CRISPR-Cas (Figura 8) (Mulhall et al., 2020; Sao et al., 2022; Xu et al., 2020).

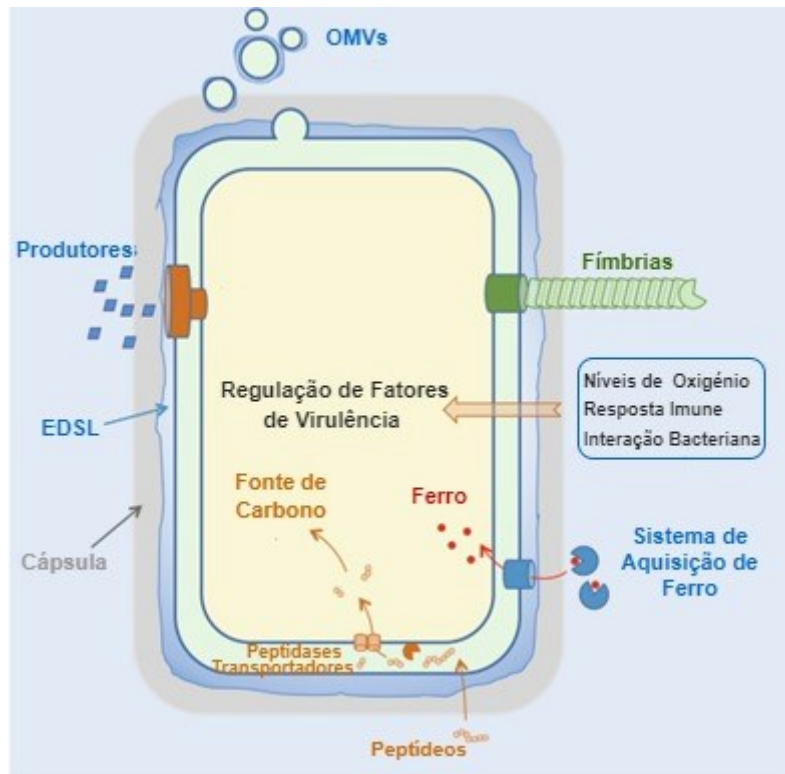


Figura 8 - Representação esquemática de células da *P.gingivalis*. A célula é circundada por uma camada superficial eletrodensa (EDSL) onde estão presentes as gingipaínas na superfície celular e a cápsula. Outros fatores de virulência incluem as fímbrias e vesículas da membrana externa. Os sistemas de aquisição de ferro e di e tri peptídeos que servem como fontes de carbono são mecanismos de aquisição de elementos essenciais. [adaptado de (Lunar Silva & Cascales, 2021)]

1.3.1 Lipopolissacárido (LPS)

O lipopolissacárido (LPS) é um componente relevante da membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas, sendo composto por uma estrutura designada lípido A, polissacárido central e antígeno O (Figura 9). O lípido A determina as propriedades de virulência do LPS e a sua estrutura química foi descrita como sendo um dissacarídeo beta (1-6) de glucosamina 1-monofosfato acilado por ácido 3-hidroxi-15-metil-hexadecanóico e ácido 3-hexadecanóxi-15-metil-hexadecanóico nas posições 2 e 20 (Xu et al., 2020). O LPS é um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (Liu et al., 2018; Stobernack, 2019). Os PAMPs ligam-se a receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) nas superfícies celulares ou nos compartimentos intracelulares (Tsukamoto et al., 2018).

Existem duas moléculas muito importantes no processo de eficiência do transporte e sensibilidade de detecção, denominadas de proteína de ligação ao LPS (LBP) e CD14. A LBP é uma glicoproteína sérica produzida, essencialmente, pelos hepatócitos, pulmões e células epiteliais gastrointestinais (Tsukamoto et al., 2018). A sua concentração sérica aumenta lentamente, atingindo o pico, aproximadamente, entre 2 e 3 dias após a infecção. Uma alta concentração de LBP inibe a inflamação induzida por LPS (Tsukamoto et al., 2018). No entanto, baixas concentrações de LBP demonstram ter uma grande afinidade com o Lípido A, promovendo a formação do complexo LBP-LPS, sendo à posteriori transportado para a membrana onde se encontra ancorado o gene CD14 (mCD14) ou CD14 solúvel (sCD14). Uma vez que o gene CD14 se liga ao complexo LBP-LPS, o LPS vai ser transferido para o CD14, que tem um domínio hidrofóbico na região N-terminal, servindo como local de ligação para o LPS (Tsukamoto et al., 2018).

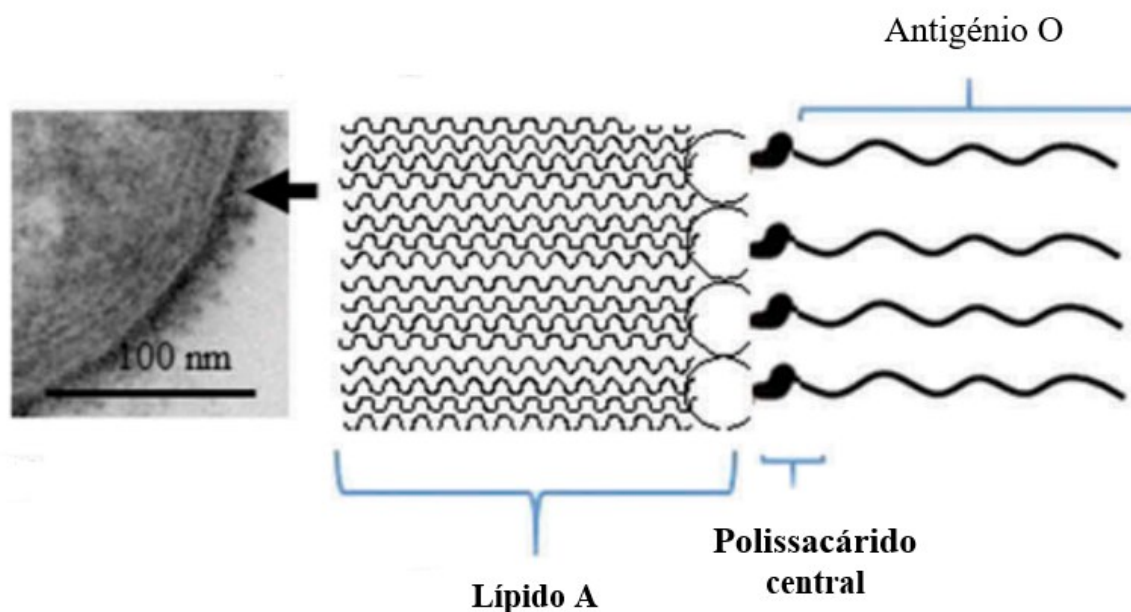


Figura 9 - Estrutura do LPS. O LPS é composto pelo lípido A, polissacarídeo central e antígeno O [adaptado de (Jia et al., 2019)]

O LPS contribui para a libertação de citocinas pró-inflamatórias detetadas nas bolsas periodontais (Liu et al., 2018). A principal via de sinalização ativada pelo LPS de *P.gingivalis* é controversa. O recetor TLR4 exerce uma função dominante neste processo, enquanto outros estudos demonstram que o recetor TLR2 é o principal recetor. Em estudos realizados, *in vitro*, em modelos animais conclui-se que o recetor TLR2 é necessário para ocorrer perda óssea causada pela *P.gingivalis* (Xu et al., 2020). De entre os diversos recetores TLR, o TLR4 é o único que tem a capacidade de formar um complexo com MD-2, de forma a capturar o LPS. Como as múltiplas cadeias acil do lípido A do LPS da *P.gingivalis* são a “chave” para o complexo MD-2/TLR4, as cadeias poliacil do LPS devem ser protegidas até que sejam incorporados no complexo MD-2/TLR4. Neste processo, as proteínas de ligação ao LPS (LBP) e CD14 melhoram a eficiência do transporte do LPS e a sensibilidade de deteção (Tsukamoto et al., 2018).

O transporte do LPS para a superfície MD-2/TLR4 na forma do complexo LBP-LPS-CD14 é um pré-requisito para a internalização do TLR4 e subsequente resposta imune (Jia et al., 2019). O recetor TLR4 tem a capacidade de iniciar duas cascatas de sinalização (Figura 10). A primeira que se denomina de diferenciação mielóide primária,

via dependente da proteína MyD88, e a segunda através da indução do adaptador que contem o domínio TIR, via dependente do interferão- β (TRIF) (Tsukamoto et al., 2018).

No primeiro caso o dímero MD-2/TLR4 presente na superfície celular recruta a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP) e MyD88. MyD88 interage com o complexo cinase associado a IL-1R (IRAK), que recruta o fator 6 associado ao recetor do fator de necrose tumoral (TRAF-6), ocorrendo a ativação da transcrição de genes de NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e interleucina 6 (IL-6) (ul Ain et al., 2020).

A endocitose do complexo MD-2/TLR4 ativa a via independente de MyD88 no comportamento endossomal. Em vez de TIRAP, a molécula adaptadora relacionada com TRIF (TRAM), recruta TRIF e ativa TRAF3. O TRAF3 é responsável pela indução a jusante de TBK1 (*Tank-binding kinase*) e IKK ϵ que leva à ativação da transcrição do fator IRF3 e do interferão do tipo I (Molteni et al., 2018).

A via independente de MYD88 estimula a fase de indução tardia da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK) e NF- κ B (Jia et al., 2019).

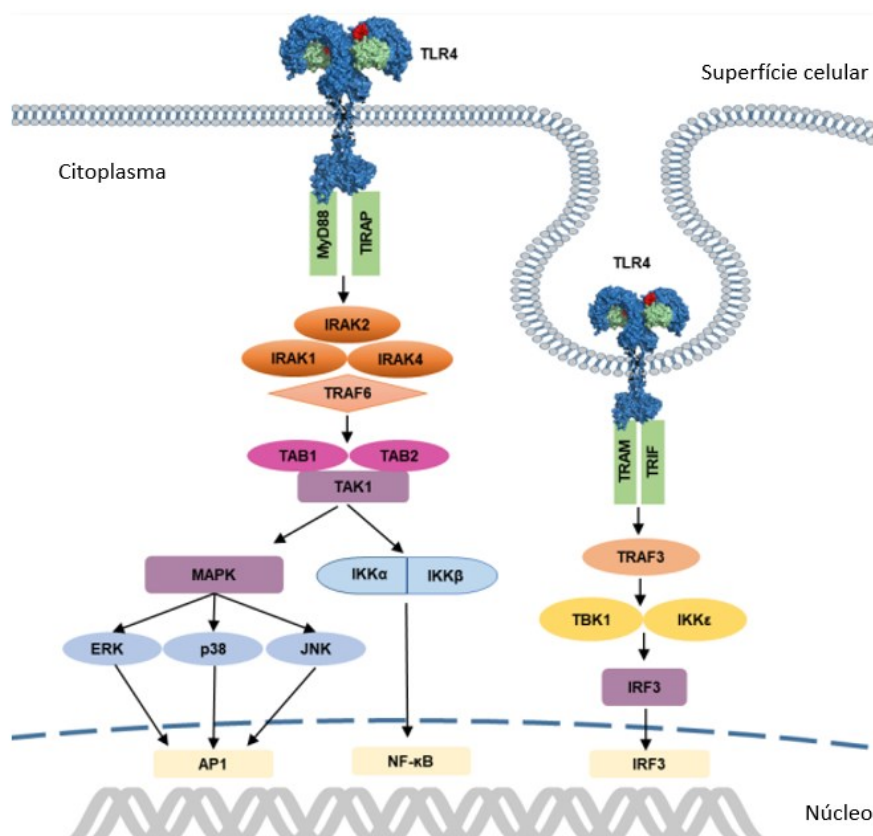


Figura 10 - Ilustração esquemática das vias de sinalização do recetor TLR4. O reconhecimento do LPS ativa vias dependentes de MyD88 e vias dependentes de TRIF. Na via dependente de MyD88, o recrutamento de MyD88 por TIRAP inicia a interação de IRAK e TRAF6, que desencadeia a ativação de fatores de transcrição. A endocitose de TLR4 inicia a sinalização dependente de TRIF que envolve o recrutamento de TRAM e TRIF que levam à indução de subseqüente de TBK1 e IKKε, bem como à ativação do fator de transcrição IRF3 [adaptado de (Molteni et al., 2018)]

1.3.2 Cápsula

A **cápsula bacteriana** é uma estrutura da camada externa da bactéria e que é composta por polissacáridos e água. A cápsula atua como um meio de proteção permitindo que as bactérias encapsuladas se tornem mais resistentes à fagocitose e morte intracelular, (Rocha et al., 2021; Xu et al., 2020).

A cápsula é antigénica (antigénio K) e quando varia na sua composição dá origem a diferentes antígenos K. Atualmente são conhecidos sete serotipos K (K1-K7) de *P. gingivalis*. Num estudo realizado por Monasterio et al (2018), as cápsulas de todos os serotipos foram estudadas para uma possível indução da resposta imunitária em

macrófagos, linfócitos T e células dendríticas. O serotipo K1 teve a capacidade de induzir linfócitos T efetores (Th1 e Th17) em maior escala do que os outros serotipos. Estes dois tipos de linfócitos efetores estão associados a doença periodontal destrutiva. Os linfócitos Th17 têm a capacidade de induzir a diferenciação e ativação dos osteoclastos, atuando de forma direta nos seus precursores e em osteoclastos maduros através da produção de RANKL. Já os linfócitos Th1, através da produção de IL-1 β , IL-12 e IFN- γ , atuam indiretamente na atividade osteoclastogénica mediante o reforço da expressão de RANKL em osteoblastos e linfócitos Th17. Os diferentes serotipos capsulares da *P. gingivalis* induzem também uma expressão diferencial de citocinas nas células dendríticas e produção de quimiocinas nos macrófagos. (Monasterio et al., 2018; Xu et al., 2020).

As estirpes encapsuladas da *P. gingivalis* têm uma taxa de sobrevivência superior, *in vivo*, em relação à estirpe não encapsulada (Xu et al., 2020). Na generalidade, a capacidade de adesão às células epiteliais gengivais da *P. gingivalis* encapsulada é inferior quando comparada à das células não encapsuladas. Foi ainda demonstrado que diferentes tipos de serotipos apresentavam capacidades de adesão diferentes (Xu et al., 2020).

1.3.3 *Pilis* Comuns

A *P. gingivalis* produz ***pilis* comuns** ou **fimbrias** que são estruturas filamentosas finas localizadas na sua superfície. Estas estruturas que se projetam da membrana exterior melhoram a motilidade e adesão bacteriana a vários tipos de superfícies, contribuem para a invasão das células do hospedeiro e são importantes na interação da *P. gingivalis* com outras bactérias (*Actinomyces viscosus*, *T. denticola* e *Streptococcus oralis*) que é indispensável para a formação do biofilme (Kumbar et al., 2021). Os *pilis* comuns ligam-se aos tecidos e células do hospedeiro através de uma enorme diversidade de moléculas e substratos orais, tais como proteínas, glicoproteínas ricas em prolina, fibrinogénio, fibronectina e lactoferrina (Hasegawa & Nagano, 2021; Jia et al., 2019; Kumbar et al., 2021; Xu et al., 2020).

A *P. gingivalis* apresenta duas formas de fimbrias, as fimbrias longas ou maiores compostas de subunidades FimA e as fimbrias curtas ou menores compostas de subunidades Mfa1, e os seus comprimentos variam entre 60-500nm (Hasegawa &

Nagano, 2021). Através das diferenças na sequência dos nucleótidos do gene FimA, as fimbrias podem ser classificadas em seis tipos (Tipo I, Ib, II, III, IV e V) (Xu et al., 2020). As fimbrias FimA são reconhecidas pelo sistema imunitário. As respostas do sistema imunitário são realizadas através de interações entre FimA e recetores *Toll-like* (TLRs) (por exemplo, TLR2), recetor de completo 3 (CR-3), CD14 e o recetor de quimiocina (CXCR4) (Hasegawa & Nagano, 2021). As fimbrias Mfa1 atuam na auto agregação e regulam o desenvolvimento do biofilme homotípico (Jia et al., 2019). As sequências de aminoácidos de FimA e Mfa1 não têm qualquer homologia com outras fimbrias bacterianas, o que demonstra que as fimbrias de *P.gingivalis* são únicas (Hasegawa & Nagano, 2021).

Resumidamente, as fimbrias do *P.gingivalis* participam na formação de biofilme, na auto-agregação, na co-agregação e adesão bacterianas às moléculas hospedeiras (Jia et al., 2019).

1.3.4 Proteases

A *P.gingivalis*, produz **proteases de lisina e de arginina**, designadamente as gingipaínas, que auxiliam na colonização e destruição dos tecidos do hospedeiro (Xu et al., 2020; Yang et al., 2021).

As gingipaínas específicas de arginina (Rgp, que inclui RgpA e RgpB) têm a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas nos grupos carbonil do resíduo de arginina; as gingipaínas específica de lisina (Kgp) clivam polipéptidos no terminal C após o resíduo de lisinas (Hirai et al, 2020; Nowakowska et al., 2021; Xu et al; 2020).

Kgp é constituído por um domínio catalítico que reconhece especificamente a ligação do péptido Lys-X e um domínio de adesão (Jia et al., 2019). Esta gingipaína corta proteínas heme do hospedeiro (exemplos, hemoglobina, haptoglobina e hemopexina) para fornecer à *P.gingivalis* proteínas fundamentais para o seu crescimento (Xu et al., 2020).

A composição de RgpA é idêntica à de Kgp, contendo um domínio catalítico que reconhece Arg-X e um domínio de adesão. O RgpB, tal como o RgpA e Kgp, contém o domínio catalítico, mas não possui o domínio de adesão (Figura 11). RgpB é crucial no processamento e maturação de FimA, enquanto RgpA e RgpB são fundamentais

no processamento proteolítico e polimerização de Mfa1 para produzir as fimbrias (Lee et al., 2018; Xu et al., 2020).

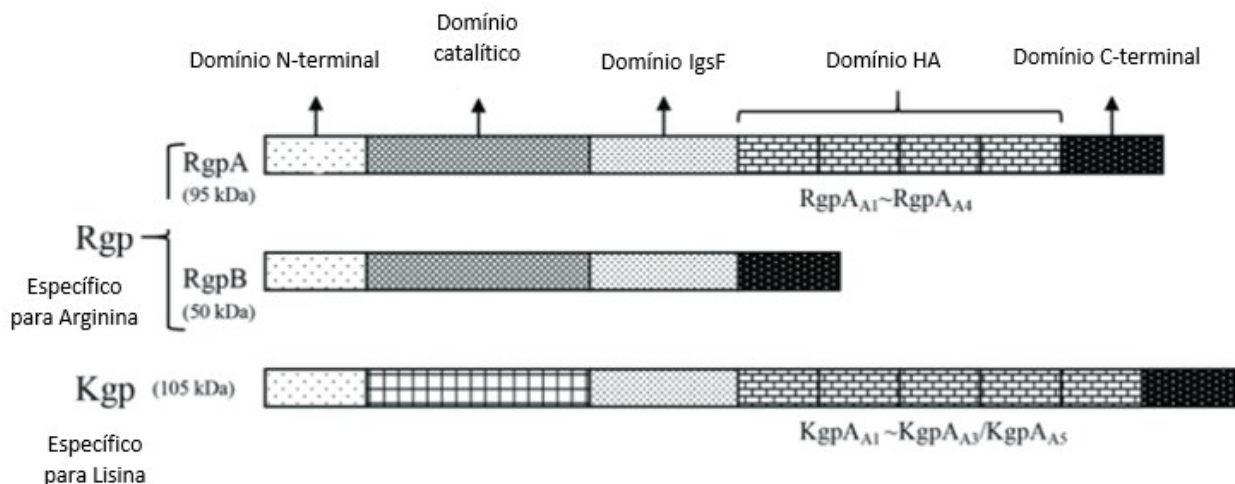


Figura 11 - Estrutura das gingipaínas. As gingipaínas são divididas em Rgp e Kgp. O Rgp é ainda subdividido em RgpA e RgpB. As gingipaínas são compostas por: péptido, domínio N-terminal, domínio da superfamília da imunoglobulina (IgsF), domínio hemaglutinina/adesão (HA) e o domínio C-terminal. A estrutura de RgpB é a mais simples, pois não contém o domínio HA. RgpA contém 4 domínios HA (denominados RgpA A1 a RgpA A4). O Kgp possui entre 3-5 domínios HA (denominados de KgpA A1 a KgpA A5) [adaptado de (Jia et al., 2019)]

As gingipaínas são responsáveis por 85% das atividades proteolíticas extracelulares da *P.gingivalis* (Takeuchi et al., 2019). Tem como principal função servir de ligação entre a *P.gingivalis* e outros agentes patogénicos, como por exemplo a *T.denticola*, de modo a promover a colonização e a sobrevivência de *P.gingivalis* no biofilme oral. Deste modo, as gingipaínas têm duas funções principais: a congregação com outras bactérias ou a adesão aos tecidos e células do hospedeiro (Jia et al., 2019).

Os domínios de adesão (hemaglutinina/adesão) das RgpA e Kgp são responsáveis pela coagregação (Xu et al., 2020). As gingipaínas também estão envolvidas no processo de adesão mediado pelas fimbrias, através da modificação e maturação da pró-fimbrilina em fimbrias.

As gingipaínas têm a capacidade de fornecer nutrientes para as bactérias e ajudar na sua proliferação. Elas degradam o fibrinogénio/fibrina o que contribui para a rutura

do tecido, inibição da coagulação e aumento do sangramento (Xu et al., 2020). A Kgp cliva proteínas heme do hospedeiro, como a hemoglobina, haptoglobina e hemopexina, de modo a fornecer heme necessário ao crescimento da *P.gingivalis* (Xu et al., 2020).

As gingipaínas fornecem à *P.gingivalis* a capacidade de evadir respostas imunes do hospedeiro. Alguns dos mecanismos envolvem a degradação de componentes da matriz celular (como por exemplo, o colagénio), citocinas, imunoglobulinas e fatores do sistema do complemento (Xu et al., 2020).

As gingipaínas degradam as moléculas do epitélio juncional, de modo a quebrar a barreira epitelial e aumentar a penetração de LPS e proteoglicanos (Takeuchi et al., 2019).

As gingipaínas estão envolvidas na regulação de respostas imunes e na produção de mediadores imunes (Jia et al., 2019). As defensinas são péptidos antimicrobianos existentes nos processos da imunidade inata e que desempenham um papel importante na eliminação dos agentes patogénicos. Nos seres humanos, as defensinas são classificadas em α -defensinas e β -defensinas (hBDs). As gingipaínas atuam nestas defensinas, degradando-as, o que resulta numa proteção de erradicação da *P.gingivalis* (Xu et al., 2020). Também atuam no recetor CD14 presente na superfície celular dos macrófagos, resultando numa diminuição da resposta à infeção (Takeuchi et al., 2019).

As gingipaínas interrompem a ativação do sistema do complemento. Estas degradam os componentes C3, C4 e C5 o que inibe não só a ativação do sistema do complemento como a formação do complexo de ataque à membrana, o que resulta na inibição da depuração bacteriana (Xu et al., 2020).

1.3.5 Outros

Além dos fatores de virulência referidos nos subcapítulos anteriores, ainda se podem relatar os seguintes, **hemolisina**, **hematoglutina**, **sistema CRISPR-Cas**, **transportadores de ferro**, **vesículas da membrana externa** e **DNA** que quando associados à *P.gingivalis* têm a capacidade de desregular diversas funções dos

organismos humanos, nomeadamente do sistema imunitário podendo causar inúmeras patologias locais e sistêmicas (Bregaint et al., 2022; Mulhall et al., 2020).

Os principais mecanismos pelos quais o heme (essencial no crescimento da *P.gingivalis*) é adquirido são via hemaglutinina, hemolisina e pelas gingipaínas.

As bactérias Gram-negativas, como é o caso da *P.gingivalis*, durante o seu crescimento libertam vesículas da membrana externa que consistem em proteínas de membrana, fosfolípidos, lipopolissacáridos, partes de periplasma, RNA e DNA (Zhang et al., 2021). As vesículas estão envolvidas na adaptação bacteriana ao stress oxidativo, aquisição de nutrientes e na comunicação com outras bactérias ou células hospedeiras. Também são responsáveis pela invasão das células hospedeiras e na sua destruição através de mecanismos patológicos, de maneira a evitar a resposta defensiva do hospedeiro (Horvat Aleksijević et al., 2022). As vesículas são formadas na zona onde a ligação entre o peptidoglicano e a membrana está enfraquecida. As vesículas da membrana externa vão sendo acumuladas ao longo da membrana externa (Zhang et al., 2021). As vesículas de membrana externa podem eliminar substâncias indesejadas (toxinas) e contêm substâncias antigénicas para a interação da bactérias com as células hospedeiras, aumentando a viabilidade da bactéria (Zhang et al., 2021).

Dentro das vesículas externas existem RNAs que são considerados mediadores da comunicação entre o hospedeiro e bactérias devido às suas capacidades de modular a expressão genética em múltiplas células e espécies (Ahmadi Badi et al., 2020).

Os sistemas CRISPR-Cas fornecem imunidade adaptativa para Bacteria e *Archaea* contra os bacteriófagos. O mecanismo utilizado pode ser descrito em 3 etapas: adaptação, expressão e interferência (Figura 12). Na **fase de adaptação** a bactéria entra, pela primeira vez, em contacto com o bacteriófago. A proteína Cas1-Cas2, juntamente com outras subunidades, clivam o DNA exógeno (invasor) em curtos fragmentos denominado de "protoespaçador" para produzir um novo espaçador. O espaçador é então inserido entre repetições no *locus* CRISPR, que também serve como "memória genética" para uma subsequente invasão (Chen & Olsen, 2019).

Durante a **fase de expressão**, o locus CRISPR é transcrito originando um precursor denominado de pré-crRNA que ao sofrer um processo de maturação, gera inúmeros crRNAs (pré-crRNA) e clivada em diversos crRNAs (cada um com uma

sequência específica do seu respectivo protoespaçador). No estado de interferência, os crRNAs ligam-se a outros complexos de RNA e guiam as proteínas (Gong et al., 2020).

No estado de **interferência**, os crRNAs ligados a outros complexos de RNA, guiam as proteínas Cas para clivar o genoma do fago, protegendo assim a célula hospedeira de infecções futuras (Gong et al., 2020).

Num estudo realizado, in vivo, por Chen & Olsen et al (2019) verificou-se que o sistema CRISPR-Cas se encontrava ativo na *P.gingivalis*, fornecendo um mecanismo de proteção contra elementos genéticos estranhos, o que determina que este sistema tem um papel importante nesta bactéria.

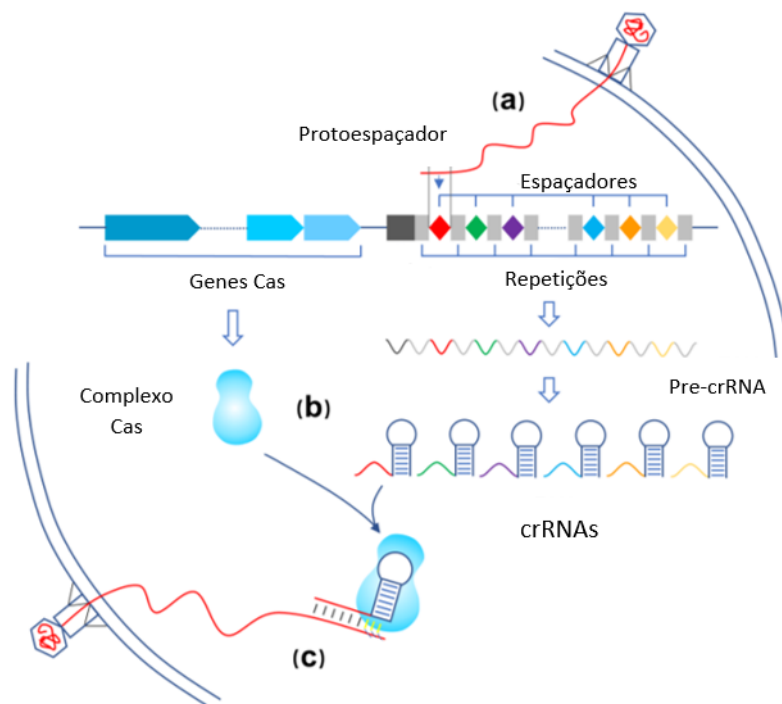


Figura 12 - Esquematização do Sistema CRISPR-Cas. (a) - adaptação: os bacteriófagos entram nas células, pequenos fragmentos de DNAs exógenos (invasores) são incorporados como novos espaçadores no locus CRISPR; (b) – expressão: o CrRNA é produzido através do locus CRISPR e, posteriormente, processos em crRNAs maduros; (c)-interferência [adaptado de (Gong et al., 2020)]

2. Doenças orais e sistêmicas causadas pela *Porphyromonas gingivalis*

Uma grande variedade de estudos já demonstrou que as bactérias periodontais estão associadas a inúmeras doenças sistêmicas, tais como diabetes, doenças cardiovasculares, nascimento pré-termo, baixo peso à nascença, doenças cerebrais, artrite reumatoide e esteatose hepática não alcoólica (EHNA) (Kadota et al., 2020). Também já foi observado que existem diferenças na microbiota oral entre doentes com cancro e indivíduos saudáveis, tendo sido associada a doença periodontal ao risco de cancro gástrico (Maquera-Huacho et al., 2022).

Como já foi referido anteriormente, o biofilme maduro causa uma maior progressão da periodontite devido à sua inflamação prolongada. Deste modo, a periodontite tem duas principais características, sendo uma doença infecciosa e uma doença inflamatória (Isoshima et al., 2021).

2.1. Periodontite

A característica talvez mais relevante da periodontite é a ativação da osteoclastogénese e como consequência a destruição do osso alveolar que é uma situação irreversível e que leva à perda de suporte dentário (Könönen et al., 2019).

O sinal inicial da doença periodontal é a gengivite que se manifesta com vermelhidão gengival, edema e sangramento. O biofilme que se forma na cavidade oral passa por 5 etapas até se tornar no biofilme maduro causador da gengivite (Figura 13) (Rath et al., 2021).

- Etapa 1 – Entrada dos microrganismos patogénicos na cavidade oral do hospedeiro;
- Etapa 2 – Congregação da microflora patogénica e posterior formação de películas salivares;
- Etapa 3 – Grande aumento no número de bactérias capazes de formar biofilme, formação de uma camada mucilagínosa, início da disbiose e da adesão irreversível;
- Etapa 4 – Troca de material genético entre as bactérias patogénicas e microflora comensal, conclusão da disbiose;

- Etapa 5 – Maturação do biofilme e propagação bacteriana.

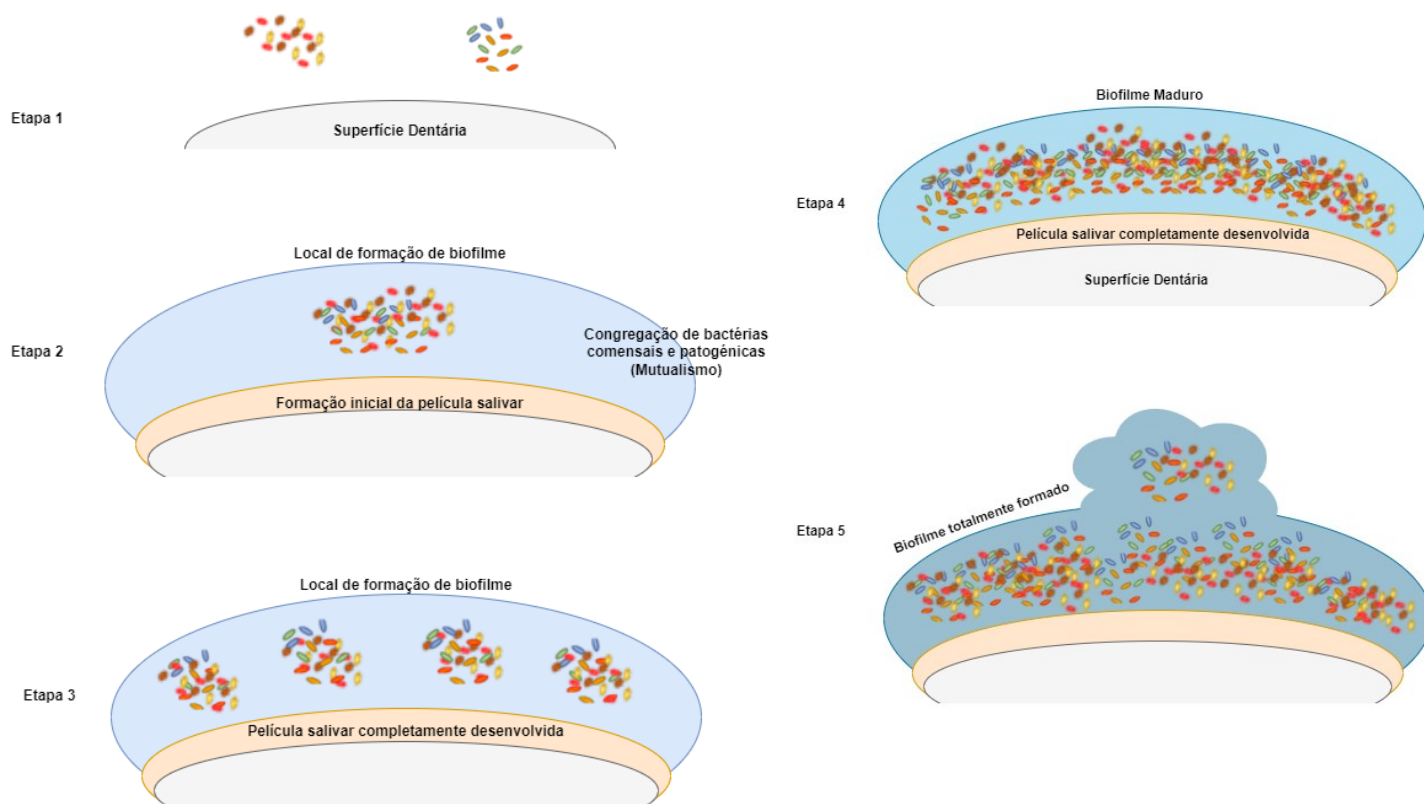


Figura 13 - Esquematização das etapas do desenvolvimento do biofilme [adaptado de (Rath et al., 2021)]

Esta gengivite causada pelo biofilme maduro ajuda na progressão da doença periodontal devido a uma inflamação prolongada da resposta imunitária do hospedeiro. Como consequência desta progressão, as diversas estruturas do periodonto são destruídas manifestando a reabsorção óssea e a recessão gengival (Rath et al., 2021).

A doença abrange interações dinâmicas complexas entre agentes bacterianos patogênicos, respostas imunitárias destrutivas por parte do hospedeiro e fatores de risco (exemplos, tabagismo, má higiene oral, sexo masculino, idade avançada, obesidade, diabetes, stress e pré-disposição genética). As principais características da periodontite são a inflamação gengival, evidencia radiográfica de perda óssea alveolar, profundidades de sondagens elevadas, mobilidade, sangramento à sondagem e migração dentária (Isoshima et al., 2021; Kwon et al., 2021; Maquera-Huacho et al., 2022; Surma et al., 2021).

2.1.1 Relação da *P.gingivalis* com a periodontite

Globalmente, aproximadamente 11% da população mundial apresenta periodontite grave, afetando 743 milhões de indivíduos. Deste modo, a periodontite está classificada como sendo a sexta doença mais prevalente em todo o mundo (Figura 14) (Kwon et al., 2021; Kumbar et al., 2021). Segundo dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* 2009–2014, 42% dos adultos nos Estados Unidos tinham periodontite, sendo que 7,8% destes apresentavam periodontite grave (Kwon et al., 2021). Este estudo comprovou que nos Estados Unidos 50% da população adulta (30 anos ou mais) apresentava alta prevalência de periodontite, o que significa que metade da população do Estados Unidos acima dos 30 anos de idade, apresenta doença periodontal (Kwon et al., 2021).

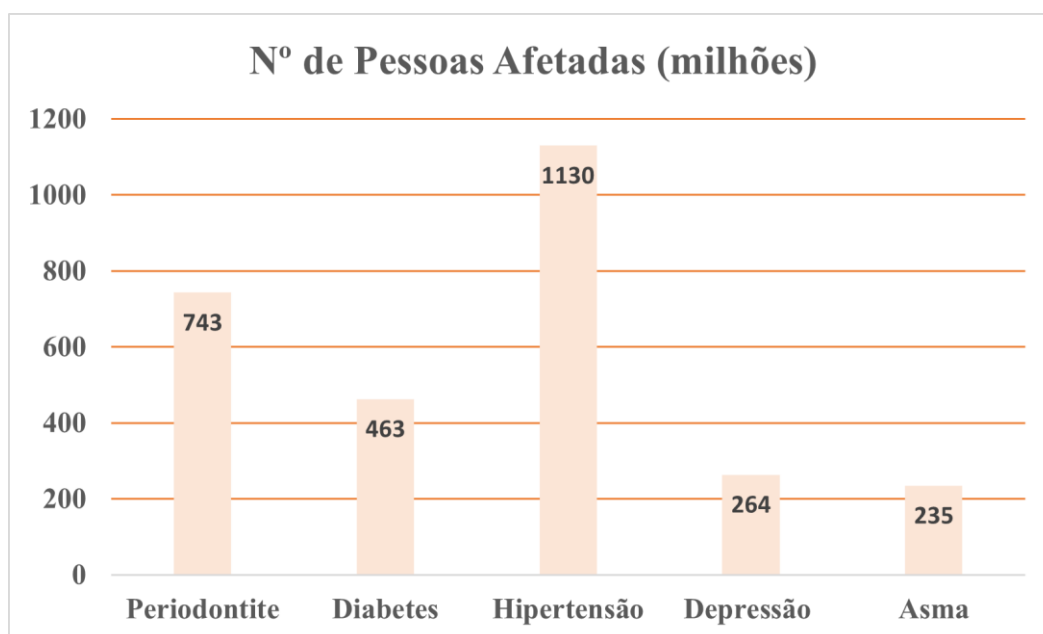


Figura 14 - Prevalência global da doença periodontal em comparação com a diabetes, hipertensão, depressão e asma [adaptado de (Kwon et al., 2021)]

A prevalência de periodontite aumenta drasticamente entre os 35 e 44 anos de idade, com pico nos 38 anos (Kwon et al., 2021). A prevalência e a extensão de perda óssea aumentam com a idade em todas as populações e a gravidade da destruição tende a ser tão enviesada que uma pequena parte dos indivíduos é responsável pela maior parte da destruição (Dahlen et al., 2020).

A *P.gingivalis* é um agente patogénico “chave” na periodontite, tendo a capacidade de modular a função e composição do microbioma oral, estando fortemente interligada a lesões periodontais com maior gravidade (Maquera-Huacho et al., 2022). Através da sua interação com células epiteliais gengivais, a *P.gingivalis* ativa a resposta imunitária inata levando ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o tecido gengival. Vai ocorrer a produção de citocinas pró-inflamatórias, proteases, quimiocinas, espécies reativas de oxigénio, enzimas degradadoras e MMPs que através de processos em cascata levam à destruição dos tecidos (Rath et al., 2021).

Vários estudos demonstraram que as MMPs são secretadas por células inflamatórias (linfócitos, macrófagos e monócitos) e por células residentes (fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais) (Chen et al., 2022). O recrutamento dos macrófagos é essencial na patogénese da periodontite pois possuem múltiplas funções, tais como a participação na iniciação e resolução da inflamação, ativação dos linfócitos (imunidade adaptativa) e reabsorção óssea alveolar (Chen et al., 2022). Várias citocinas pró-inflamatórias aparecem elevadas na periodontite crónica, sendo a TNF- α uma das mais notáveis, secretada por macrófagos M1 (CD80/86+) (Huck et al., 2020).

A *P.gingivalis* promove a inflamação periodontal e reabsorção do osso alveolar através da estimulação da produção de linfócitos Th1 (célula T auxiliar) e Th17 e da ativação de vias de reabsorção pró-óssea dependentes do fator nuclear kappa B (NF- κ B) através do recetor ativador do factor nuclear κ B (RANKL), inibindo a diferenciação dos osteoblastos e diminuindo a produção de osteocalcina (Lundmark et al., 2019). Uma vez que o RANKL é regulado positivamente (estimulador de formação de osteoclastos maduros) e a osteoprotegerina (OPG) regulada negativamente (bloqueador da ação RANKL), a degradação do osso progride. Quando a resposta imune é alterada, as MMPs são libertadas através de neutrófilos e células T, mediando a perda óssea alveolar (Lundmark et al., 2019). Os monócitos nos tecidos que se encontram inflamados diferenciam-se em osteoclastos, acelerando a reabsorção óssea através da produção de fatores mediadores pró-inflamatórios. Os macrófagos produzem e secretam um variado grupo de citocinas (IL-1 β , IL-23, IL-6, TNF- α e MMPs) que atuam na osteoclastogénese e na degradação do colagénio (Figura 15) (Könönen et al., 2019).

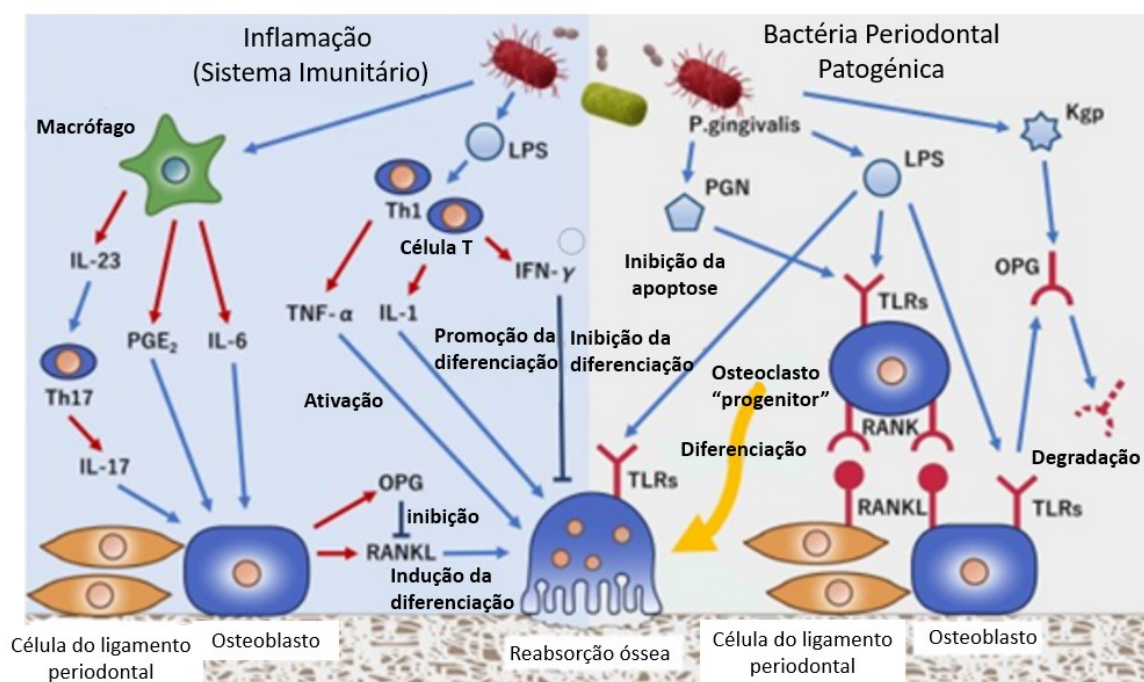


Figura 15 - Mecanismo molecular da formação e ativação dos osteoclastos pela *P. gingivalis*. A *P. gingivalis* promove a osteoclastogênese direta e indiretamente via indução do sistema imunológico [adaptado de (Usui et al., 2021)]

Resumidamente, a patogênese da periodontite inicia-se quando o biofilme se aglomera nos sulcos gengivais. Certas substâncias presentes no biofilme (como o LPS e toxinas) ativam uma resposta imunitária no hospedeiro, tendo como consequência a libertação de vários mediadores inflamatórios, tais como a prostaglandina E2, citocinas como as interleucinas (ILs) e o TNF- α e enzimas proteolíticas incluindo as MMPs. No decorrer da formação de bolsas periodontais, a formação de novos tecidos pelas células residentes (queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos) é suprimida, ao invés disso a degradação dos tecidos por neutrófilos, macrófagos e osteoclastos é estimulado. (Könönen et al., 2019; Lundmark et al., 2019).

Caso a periodontite não seja precocemente tratada, pode levar à destruição do tecido conjuntivo de suporte dos dentes e do osso alveolar, levando por fim à perda dentária. (Maquera-Huacho et al., 2022).

2.2 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, sendo definida como uma doença neuroinflamatória progressiva e neurodegenerativa do cérebro (Ryder, 2020). É considerada a causa principal de problemas cognitivos e transtornos comportamentais, ocorrendo uma perda lenta e progressiva de uma ou mais funções do sistema nervoso. As principais características da DA são a formação de placas amiloides (depósitos extracelulares de beta-amiloide) e a formação de emaranhados neurofibrilares (Singhrao & Olsen, 2019). Na ocorrência destes processos patológicos podem observar-se a perda de sinapses e de neurónios, levando a uma atrofia macroscópica. Existem alguns fatores de risco para o desenvolvimento desta doença, tais como periodontite crónica, idade avançada e ainda perda de até nove dentes (Matsushita et al., 2020; Ryder, 2020; Singhrao & Olsen, 2019; Zhang et al., 2021).

Segundo a *Alzheimer's Disease International* (ADI, 2020) existem, mundialmente, mais de 50 milhões de pessoas com demência no ano de 2020. Estima-se que esse número será, aproximadamente, o dobro daqui a 20 anos atingindo cerca de 82 milhões em 2030 e 145 milhões em 2050.

2.2.1 Relação da *P.gingivalis* com a Doença de Alzheimer's

A *P.gingivalis* é encontrada, maioritariamente, em infeções gengivais e periodontais, porém em 25% dos casos também ser encontrada em indivíduos com saúde periodontal (Genco & Sanz, 2020). A bacteremia transitória pode ocorrer em tarefas diárias (escovagem, utilização de fio dentário, mastigação) e em procedimentos médico dentários, resultando numa translocação da bactéria para diversos tecidos (Kanagasingam et al., 2020).

Vários estudos evidenciaram a presença da *P.gingivalis* em cérebros humanos, através de autopsias aos mesmos em pessoas diagnosticadas com DA e também no líquido cefalorraquidiano. Nestas análises, as gingipaínas foram encontradas associadas a neurónios, emaranhados neurofibrilares e a placas amiloides (Genco & Sanz, 2020; Ryder, 2020).

A *P.gingivalis* pode alcançar o cérebro e propagar-se através de certas vias, tais como:

- Infecção de monócitos, seguida de recrutamento cerebral;
- Infecção e danos diretos a células endoteliais que protegem a barreira hematoencefálica;
- Infecção e propagação através de nervos cranianos (por exemplo, o nervo trigêmeo).

Após o acesso ao cérebro, sugere-se que a *P.gingivalis* se espalhe lentamente durante muitos anos, de neurónio para neurónio (Dominy et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, aquando de uma infecção por *P.gingivalis*, as citocinas inflamatórias estão em quantidade elevada no sangue dos pacientes. Estes mediadores inflamatórios podem exacerbar uma inflamação cerebral na Doença de Alzheimer (Matsushita et al., 2020). A infecção bacteriana e a inflamação crónicas consequentes da doença periodontal enfraquecem a barreira hematoencefálica e representam um risco acrescido para doenças cerebrovasculares (Matsushita et al., 2020).

Kanagasingam et al (2020), analisou diversos estudos in vivo e in vitro sobre o papel da *P.gingivalis* na patogénese da DA. Desta forma, conclui que a entrada bacteriana no cérebro ocorre através de uma via mecânica através das gingipaínas proteoliticamente ativas, quebram as proteínas epiteliais transmembrana (E-caderina, integrina e ocludina), interrompendo as junções entre as células epiteliais. Deste modo, a permeabilidade da barreira hematoencefálica aumenta (Kanagasingam et al., 2020). Também conclui que o aumento da circulação sistémica de citocinas pro-inflamatórias (induzidas pelos fatores de virulência da *P.gingivalis*), ao penetrarem na barreira hematoencefálica induzem uma posterior neuroinflamação (Ding et al., 2018). Um estudo realizado, em modelos animais (ratos), por Dominy et al (2019), demonstrou que as gingipaínas, são responsáveis pela produção de fatores de patogenicidade (Rgp e Kgp) que têm a capacidade de danificar a proteína TAU que tem uma elevada importância para a normal função neuronal (Ding et al., 2018; Dominy et al., 2019; Nie et al., 2019).

Um estudo realizado, in vitro, por Nie et al (2019) admite que a infecção crónica sistémica provocada pela *P.gingivalis* induziu a acumulação de A β em macrófagos/monócitos inflamatórios mediante a ativação do sistema de sinalização CatB/NF- κ B, insinuando que os macrófagos/monócitos servem como agente de circulação de A β em doentes periodontais.

No entanto, os mecanismos exatos pelos quais a periodontite emite o sinal inflamatório para o cérebro ainda não estão bem definidos. Deste modo, são necessários mais estudos para clarificar a relação entre a periodontite e a doença de Alzheimer. Para tal, é necessário cumprir três critérios:

- O primeiro critério é a associação entre as duas doenças, que implica demonstrar que a periodontite ocorre em simultâneo com a doença de Alzheimer;
- O segundo critério é a identificação de um mecanismo biológico credível pelo qual a periodontite pode iniciar ou proporcionar o desenvolvimento da doença de alzheimer;
- O terceiro critério é a demonstração de que o tratamento para a periodontite, por si só, altera ou modifica a condição associada (Dominy et al., 2019).

De maneira a elucidar a relação entre ambas as doenças, a figura 16 exemplifica os fatores de risco partilhados entre as duas doenças que compreendem os fatores genéticos, ambientais e comorbilidades, apoiando a legitimidade da relação entre a doença periodontal e a doença de Alzheimer.

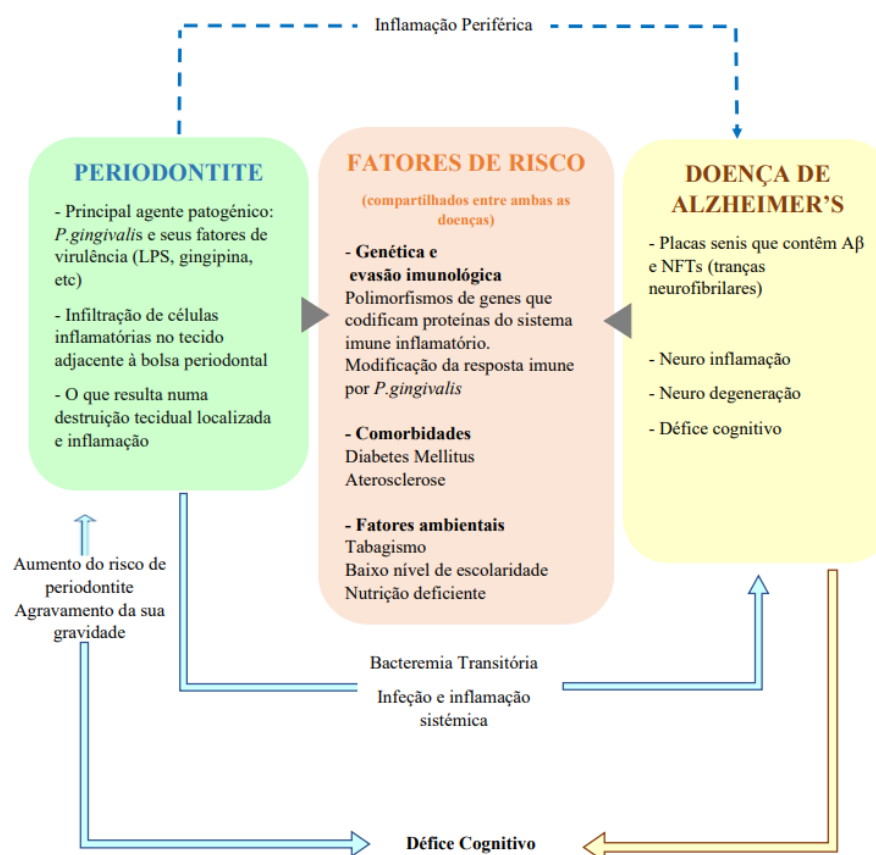


Figura 16 - Relação entre a periodontite e a doença de Alzheimer's. A *P. gingivalis* tem a capacidade de entrar na corrente sanguínea durante uma bacteremia transitória e obter ao acesso ao cérebro por diversas vias, incluindo através da barreira hematoencefálica. Esta invasão microbiana, tem como consequência a ocorrência de neuro inflamação com posterior neuro degeneração e déficit cognitivo. As placas senis presentes na doença de Alzheimer são depósitos da proteína beta-amiloide, Ambas as doenças partilham alguns fatores de risco o que sugere que haja uma relação causal entre ambas. [adaptado de (Kanagasingam et al., 2020)]

Não há cura ou tratamento que seja eficaz contra a doença de Alzheimer. A prevenção da doença de alzheimer, poderia passar pelo tratamento e prevenção da doença periodontal adotando bons hábitos de higiene e erradicando certos hábitos, como por exemplo o tabagismo (Kanagasingam et al., 2020).

Apesar de ambas as doenças estarem associadas à inflamação, o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), não manifesta qualquer benefício para a redução da gravidade da doença de Alzheimer. Uma experiência com citocalasina D inibiu de forma significativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios na microglia, o que pode

demonstrar uma nova abordagem para controlar a DA (Fernandes Costa et al., 2020; Dominy et al. 2019).

2.3 Carcinoma de células escamosas na cavidade oral

O carcinoma de células escamosas é a doença maligna mais comum na região da cabeça e do pescoço. Os principais de fatores de risco associados são o tabagismo, alcoolismo, mascar noz de areca (semente da palmeira de areca), dieta, deficiências de vitaminas/minerais, exposição profissional e condições hereditárias (Chen et al., 2021). Outros fatores que podem proporcionar o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas na cavidade oral, tais como infecções virais, fúngicas, bacterianas e periodontite crônica (Figura 16) (Chen et al., 2021; Pignatelli et al., 2022).

As superfícies corporais estão sujeitas a agressões recorrentes e alterações ambientais. Os traumas, infecções, dieta e mutações podem contribuir para rutura das barreiras mucosas do corpo humano. Na maior parte dos indivíduos, estas barreiras são rapidamente recompostas e a homeostase é recuperada. No entanto, a resiliência do hospedeiro e/ou as alterações ocorridas na microbiota podem contribuir para a persistência da rutura destas barreiras e, conseqüentemente, levar ao fracasso do restabelecimento da homeostase.

2.3.1 Relação da *P.gingivalis* com o carcinoma de células escamosas na cavidade oral

A nível mundial, o cancro oral é responsável por 2-4% dos casos de cancro, sendo o sexto cancro mais prevalente. O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna comum, sendo que de todas as neoplasias orais, este carcinoma representa 90% dos casos. A percentagem de doentes com 5 anos de sobrevivência do carcinoma de células escamosas, varia entre 40 e 50%. (Geng et al., 2020).

De acordo com a *American Cancer Society* (ACS, 2022), nos EUA, em 2022 houve cerca de 54 mil casos de cancro oral ou esofágico e, aproximadamente, 11.230 mil mortes em consequência dos mesmos.

A carcinogénese é um processo complexo que abrange várias etapas de alterações celulares causadas por distintos elementos carcinogénicos que desregulam a atividade do genoma a nível molecular (Pignatelli et al., 2022). Estas alterações podem dever-se a mecanismos genéticos (devido a modificações na sua disposição genética ou a mutações) ou devido a alterações enzimáticas (metilação). A carcinogénese engloba três etapas; (Mendoza et al., 2020):

- A primeira etapa, também chamada de iniciação, os elementos biológicos cancerígenos introduzem co proteínas no genoma da célula-alvo (que se tornará numa célula maligna), alterando o código genético da mesma, ativando proto-oncogenes e inativando os genes supressores do tumor;
- A segunda etapa, denominada por promoção, promove o desenvolvimento do crescimento tecidual e do cancro, progredindo através da superexpressão de recetores e de fatores de crescimento, citocinas, destruição da matriz extracelular, angiogénese, entre outros.
- Na terceira e última etapa, definida como progressão, as células malignas invadem os tecidos e as alterações moleculares prosseguem.

A inflamação crónica tem sido relatada como um mecanismo através do qual as bactérias orais contribuem para a carcinogénese oral. Esta inflamação pode, ainda, induzir imunossupressão contribuindo para o desenvolvimento do cancro. (Zhan et al., 2019).

Como referido anteriormente, a *P.gingivalis* através dos seus fatores de virulência induz citocinas e quimiocinas, tais como IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β (Zhan et al., 2019). Estes mediadores inflamatórios podem induzir ou facilitar a proliferação celular, mutagénese, ativação oncogénica e angiogénese (Karpinski, 2019).

As etapas nas quais a *P.gingivalis* poderá desempenhar um papel relevante são a **transcrição** epitélio-mesenquimal das células epiteliais orais, **proliferação** das células neoplásicas e a **invasão** do tumor nas células (Mendoza et al., 2020).

No que diz respeito à **transição** do epitélio mesenquimal (EMT), ocorre uma alteração nas células epiteliais orais, perdendo as propriedades de adesão. Este processo de transição do epitélio mesenquimal é executado pelos chamados fatores ativadores de

EMT, principalmente pelo SNAIL, TWIST e ZEB. A *P.gingivalis*, através do seu fator de virulência Fim A, é um fator de indução para o gene ZEB1. (Mendoza et al., 2020).

Um estudo realizado por Karpinski (2019), in vivo, em modelos animais, a *P.gingivalis* aumentou a expressão do recetor TLR2, que por sua vez aumentou a expressão de MMP9, TNF- α e IL-6. A IL-6, por sua vez, por meio de STAT3. MMP9, TNF- α e IL-6 aumentaram a proliferação e o crescimento das células cancerígenas.

Ainda sobre a relação da *P.gingivalis* com o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas, um estudo realizado in vitro, analisou a superexpressão dos recetores BH-H1 e B7DC, em queratinócitos humanos saudáveis, aquando da infeção pela bactéria (Mendoza et al., 2020). Os efeitos negativos destes recetores, a inativação das células T e a indução da apoptose, o que permite que as células malignas evitem a vigilância imunitária, ocorrendo erros no controle das mesmas enquanto se sucede a progressão do tumor (Chen et al., 2021; Geng et al., 2020; Mendoza et al., 2020; Pignatelli et al., 2022).

Em relação ao tratamento e prevenção do cancro oral relacionado com a *P.gingivalis*, é crucial realizar testes salivares de modo a verificar quais as bactérias mais predominantes na saliva do paciente, pois as bactérias ajudam na deteção do cancro oral. Com esta medida, realizada em consultório, pode reduzir-se, de forma significativa, a morbilidade e mortalidade do cancro oral. A utilização de antibióticos, com intenção de erradicar a bactérias *P.gingivalis*, também se demonstra ser eficaz na prevenção do cancro (Zhang et al., 2019).

2.4 Diabetes mellitus

A diabetes mellitus é uma doença metabólica crónica que é consequência de alterações fisiopatológicas que levam ao aumento dos níveis de glicemia no sangue. A principal causa desta doença deve-se ao facto de ocorrer uma alteração na secreção de insulina (Petersmann et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Os fatores de risco **não modificáveis** para o desenvolvimento da diabetes mellitus são a idade avançada, sexo masculino, raça, etnia, baixo estado socioeconómico e predisposição genética. Já os fatores de risco modificáveis incluem o tabagismo,

alcoolismo, obesidade, sedentarismo e elevado consumo de açúcares refinados (Genco & Sanz, 2020).

Diversos estudos têm demonstrado a relação bidirecional da doença periodontal e da diabetes mellitus (Genco & Sanz, 2020). As pessoas com diabetes mellitus têm mais tendência a padecer de periodontite, pois o excesso de glicose estimula o aumento da expressão da NF- κ B, ativa os fibroblastos no ligamento periodontal, aumenta as relações RANKL/OPG, os níveis das expressões dos produtos finais da glicação avançada (importantes mediadores patogénicos na diabetes, capazes de alterar, de forma irreversível, estruturas biológicas) ROS e mediadores inflamatórios (Zheng et al., 2018). Todos estes fatores induzem a apoptose dos osteoblastos e formação de osteoclastos, levando ambos os processos ao aumento da reabsorção óssea e redução da formação de osso, promovendo desta forma a perda de osso alveolar na doença periodontal. (Zhang et al., 2021).

2.4.1 Relação da *P.gingivalis* com a diabetes

Globalmente, em 2019, a prevalência da Diabetes foi de, aproximadamente, de 9,3% (463 milhões de pessoas, com tendência a aumentar para 10.2% (578 milhões de pessoas) até 2030 e 10, 9% (700 milhões) em 2045 (Saeedi et al., 2019).

Segundo um estudo realizado pelos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2022), nos Estados Unidos da América, existem um total de 37.3 milhões de pessoas a sofrer de diabetes mellitus (11.3% da população dos EUA). Em 96 milhões de americanos em idade adulta, 1 em cada 3 sofre de pré-diabetes e 8 em cada 10 com pré-diabetes desconhece padecer da patologia. Em 2019, foram diagnosticados, aproximadamente, 1.4 milhões de novos casos de diabetes.

Um estudo realizado, em ratos, por Seyama et al (2020) demonstrou que as vesículas da membrana externa (proteínas da membrana externa) da *P.gingivalis* transportam gingipainas ativas que são depositadas no fígado e que diminuem a via de sinalização Akt/glicogénio sintetase kinase-3 β (GKS-3 β) induzida por insulina, causando assim alterações nas células HepG2 hepáticas, resultando num aumento de glicose na circulação sanguínea (Zhang et al., 2021).

A insulina controla os níveis de glicose no sangue, diminuindo a produção hepática de glicose e aumentando o uso de glicose periférica. A insulina ativa a cinase serina/treonina Akt e o glicogénio sintase cinase 3 beta (GSK-3 β) – sinalização celular mediada por glicogénio sintase cinase (GSK) e manutenção dos níveis normais de glicose no sangue, estimulando a síntese de glicogénio nas células hepáticas. A desregulação do complexo Akt/GSK-3 β sob a estimulação de insulina, resulta em hiperglicemia. As gingipaínas da *P.gingivalis* estimulam esta desregulação do complexo Akt/GSK-3 β , inibindo assim a síntese de glicogénio estimulada pela insulina nas células hepáticas (Seyama et al., 2020). Deste modo, verifica-se que a *P.gingivalis* não está diretamente envolvida na doença diabetes, mas sim no controlo da mesma após esta estar estabelecida.

Atualmente, ainda não existem evidências de que o tratamento da periodontite consiga eliminar a diabetes (Genco & Sanz, 2020).

2.5 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença autoimune inflamatória crónica que se caracteriza por causar destruição da cartilagem e da cápsula articular, sendo que nos casos mais graves pode levar a deformidades articulares (Kriauciunas et al., 2019).

2.5.1 Relação da *P.gingivalis* com a artrite reumatoide

Globalmente, a artrite reumatoide afeta 0.1-2% da população mundial (Almutairiet al., 2021).

De acordo com a *American College of Rheumatology*, aproximadamente, 1.3 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América sofrem de artrite reumatoide (AR), o que representa 0.6 a 1% da população. Destes números, é de realçar que 75% dos casos são indivíduos do sexo feminino (Almoallim et al., 2021).

A alta prevalência da AR pode dever-se à sua etiologia que se centra nos fatores genéticos (alelo HLA-DRB1), obesidade, alterações hormonais, poluição ambiental (por exemplo, pesticidas) e hábitos nocivos. De salientar que entre os fatores nomeados anteriormente, os fatores genéticos representam 60% dos casos de AR (Kriauciunas et al., 2019).

Também um agente infeccioso pode ser um fator desencadeante desta doença. O fator reumatoide (FR) é um auto-anticorpo específico para o fragmento Fc da IgG. Este fator ao reagir contra a IgG forma imunocomplexos que atingem e destroem os tecidos saudáveis, como é o exemplo da cartilagem e da cápsula articular (Kriauciunas et al., 2019). Deste modo, o exame realizado a este fator é um marcados essencial para o diagnostico da AR A citrulinização é uma modificação enzimática pós-tradução que converte um resíduo de arginina num resíduo de citrulina. Esta reação é catalisada por enzimas dependentes de iões de cálcio, denominadas de desaminases de peptidilarginina (PPADs).

A *P.gingivalis* tem a capacidade de expressar estas enzimas, sendo deste modo relacionada com a doença artrite reumatoide (Krutyhołowa et al., 2022). Diversos estudos comprovaram que a citrulinização de queratina e flagrina ou a citrulinização da proteína básica da mielina garante o isolamento elétrico das bainhas de mielina (Krutyhołowa et al., 2022). Porém, uma citrulinização extensa ou inadequada pode levar a alterações patológicas. A substituição de arginina, que desempenha um papel central na integridade estrutural e funcional das proteínas, pode alterar o enovelamento das mesmas e, desta forma, novos epítomos são expostos ao sistema imunitário (Krutyhołowa et al., 2022).

Atualmente, o colagénio tipo II, fibrinogénio, vimentina e α -enolase foram identificados como auto-antigénios citrulinados (Kriauciunas et al., 2019). Todas estas proteínas podem ser encontradas nas articulações, podendo formar complexos imunes com anticorpos, mediando mais reações inflamatórias (Krutyhołowa et al., 2022). Ao citrulinar proteínas no periodonto, a enzima PPAD da *P. gingivalis* pode desencadear a produção de anticorpos anti proteína citrulinada (ACPAs) que podem reagir de forma cruzada com proteínas citrulinadas nas articulações, tendo como principal consequência uma inflamação crónica com possível destruição articular (Krutyhołowa et al., 2022). No entanto, a capacidade de a *P.gingivalis* ter a capacidade de expressar PPAD não é o único fator de virulência capaz de desencadear a AR. Também as gingipaínas que sendo enzimas proteolíticas, degradam as proteínas da matriz extracelular do hospedeiro tais como, laminina, fibronectina e componentes do sistema de complemento. (Krutyhołowa et al., 2022).

Em relação ao tratamento da AR é de realçar que o tratamento primário da doença periodontal pode não só ajudar a manter a saúde da cavidade oral, como também

impedir a propagação de bactérias para os tecidos circundantes evitando o desenvolvimento da doença (Krutyholowa et al., 2022).

2.6 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença crônica que ocorre, com maior frequência, nas artérias de médio e grande porte, sendo considerada como a origem da maiorias das doenças cardiovasculares. Esta doença desenvolve-se a partir da acumulação de gorduras e materiais fibrosos nas paredes das artérias, levando à redução ou bloqueio do fluxo sanguíneo (Genco & Sanz, 2020; Zhang et al., 2021).

2.6.1 Relação da *P.gingivalis* com a aterosclerose

A aterosclerose é uma doença que origina ataques cardíacos, derrames e doenças vasculares periféricas, que são a principal causa de morte a nível mundial (Zhang et al., 2021). O número de doentes cardiovasculares tem vindo, ano após ano, a aumentar, tendo duplicado num intervalo de 29 anos, passando de 271 milhões à data de 1990 para 523 milhões no ano de 2019 (Song et al., 2020). O número de mortes por doença cardiovascular em 1990 foi cerca de 12.1 milhões e em 2019 atingiu os 18.6 milhões, mundialmente (Song et al., 2020). Até 2030 estima-se que, aproximadamente, 23.6 milhões de pessoas morrerão, anualmente, devido a doenças cardiovasculares (Song et al., 2020).

A taxa de incidência, mundialmente, da doença aterosclerótica é superior em indivíduos com doença periodontal em comparação com indivíduos que não apresentam esta doença (Genco & Sanz, 2020).

Há dois mecanismos possíveis para esta relação (Schenkein et al; 2020). O mecanismo que envolve a microbiota, que através de uma invasão celular vascular, pode levar ao desenvolvimento das lesões do ateroma; e os mecanismo inflamatórios e imunológicos que influenciam, de forma direta, a patobiologia da lesão do ateroma.

O processo patológico da aterosclerose está relacionado com atividades fisiológicos e transformação de diversas células, tais como células endoteliais (CEs), células

musculares lisas vasculares (CMLV), macrófagos, células T e células dendríticas (CDs) (Schenkein et al; 2020). À medida que ocorre a progressão da doença, ocorre a descamação de áreas no endotélio e as plaquetas aderem a essas mesmas áreas. Como consequência, os monócitos circulantes são recrutados do sangue para a camada subíntima e modificam as lipoproteínas, diferenciando-se em células espumosas (Schenkein et al; 2020). O stress oxidativo é um fator crucial na aterosclerose. O stress oxidativo endotelial promove a adesão dos monócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o que leva à disfunção endotelial, sendo um importante precursor das lesões ateroscleróticas (Reyes et al., 2020).

A *P. gingivalis* pode aumentar, significativamente, a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e de radicais livres de superóxido, destruindo a função endotelial. Todo este processo é realizado pela via de sinalização TLRs-NF-kB (Reyes et al., 2020).

A *P. gingivalis* tem ainda a capacidade de ativar a proteína de repetição rica em leucina com domínio de ligação a nucleótidos (NRL) e de promover a produção de inflamassomas do recetor 3 com domínio de pirina (NLRP3) em células endoteliais (Zhang et al., 2021). Deste modo, IL-1b e IL-18 começam a ser secretados, estimulando a ocorrência de processos inflamatórios adicionais e stress oxidativo do endotélio (Reyes et al., 2020).

Após ocorrer o stress oxidativo, a *P. gingivalis* desencadeia uma resposta ao processo inflamatório nos vasos sanguíneos. Comprovou-se que a *P. gingivalis* tem a capacidade de aumentar os fatores pró-inflamatórios IL-1b, IL-6, TNF- α e interferon gama (IFN-g) nas células endoteliais (Reyes et al., 2020). Também as células endoteliais estimuladas por LPS, fimbrias e gingipaína de *P. gingivalis* expressam altos níveis de MCP-1, ICAM-1, IL-8, P-selectina e E-selectina, assim como os seus recetores C-C, recetor de quimiocina tipo 2 e integrina α M β 2 (Zhang et al., 2021). Todas estas proteínas têm a capacidade de aumentar a adesão e migração, iniciando e promovendo a inflamação o que leva ao desenvolvimento da aterosclerose. Nomeadamente, a IL-8 tem sido evidenciada em diversos estudos como potenciadora da permeabilidade endotelial, sendo que esta interleucina é regulada de forma positiva pelo LPS da *P. gingivalis* (Reyes et al., 2020).

A permeabilidade da barreira endotelial também é um importante fator nas respostas inflamatórias que desencadeiam a aterosclerose. Os fatores de virulência da *P. gingivalis* como o LPS e gingipaína podem contribuir para a destruição da barreira endotelial na junção célula-célula endotelial, induzindo a decomposição de moléculas de adesão como

VE-caderina e N-caderina (Zhang et al., 2021). Durante este processo, a proteína de adesão das células endoteliais plaquetárias e a integrina beta-1 é clivada e destruída pela *P.gingivalis* nas células endoteliais, permitindo a transmigração de leucócitos (Zhang et al., 2021).

O LPS da *P.gingivalis* tem a capacidade de promover a internalização de VE-caderina nas células endoteliais, que desempenham um papel importante na regulação da permeabilidade da célula endotelial e ainda promove a transição das células endoteliais para células mesenquimais através da regulação de p38, Erk1 e p65 (Zhang et al., 2021). As gingipainas da *P.gingivalis* induzem a apoptose das células endoteliais através da ativação das caspases 3, 8 e 9 (Zhang et al., 2021). A *P.gingivalis* também promove a coagulação vascular e inflamação relacionadas com a degradação e inativação de trombomodulina na superfície das células endoteliais (Figura 17) (Zhang et al., 2021).

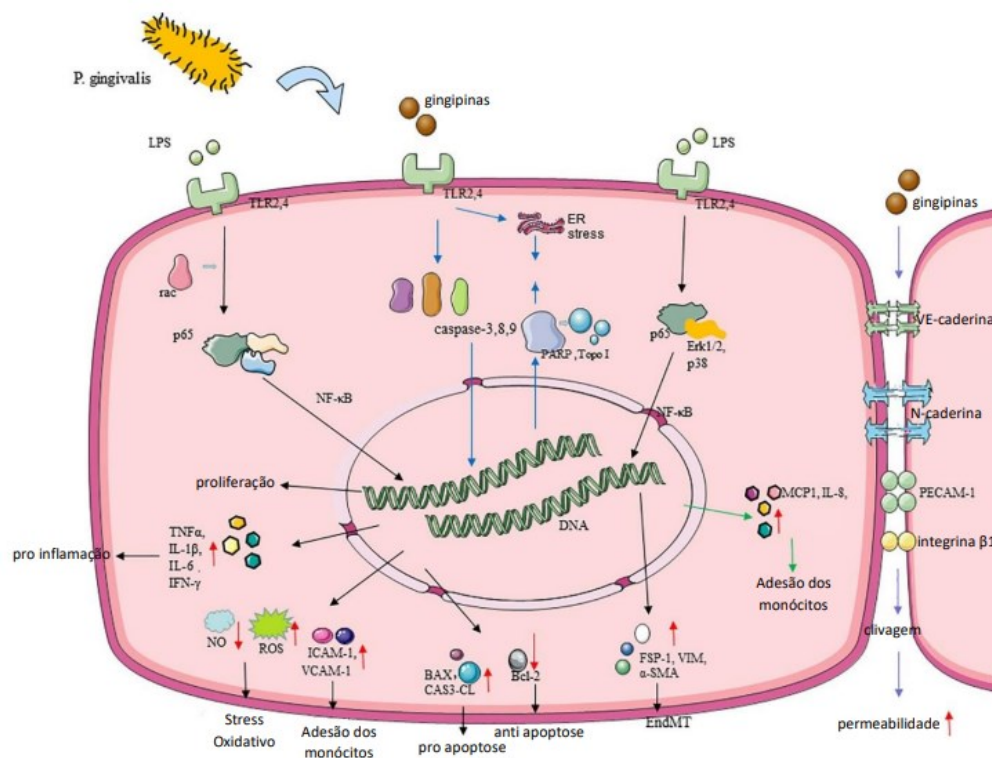


Figura 17 - Cascatas moleculares ativadas por *P.gingivalis* em células endoteliais. O recetor TLR medeia o reconhecimento de *P.gingivalis*. A *P.gingivalis* promove o stress oxidativo, através de TLRs–NF-κB e inflamassomas NLRP3. A *P.gingivalis* induz a apoptose de células endoteliais através da ativação das caspases 3, 8 e 9, sendo que as suas gingipainas também podem induzir a apoptose das células endoteliais através da indução da clivagem de PARP e topo I. O LPS da *P.gingivalis* promove a transição do epitélio mesenquimal através da regulação de p38, Erk1/2. *P.gingivalis* aumenta a migração de monócitos com uma expressão aumentada de MCP-1, ICAM-1, IL-8, P-selectina, E-selectina em células endoteliais [adaptado de (Zhang et al., 2021)]

O tratamento prévio da doença periodontal pode prevenir o desenvolvimento da aterosclerose, assim como a adoção de hábitos de vida saudáveis (dieta, exercício físico, etc) (Zhang et al., 2021). No entanto, após o desenvolvimento da doença, o tratamento da doença periodontal não parece ser eficaz para a resolução da aterosclerose (Zhang et al., 2021).

2.7 Esteatose Hepática Não Alcoólica (EHNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a principal doença crónica originada pela obesidade e compreende a esteatose simples e esteatose hepática não alcoólica (EHNA) que se define como uma inflamação com degeneração dos hepatócitos, seguida de fibrose hepática (Nagasaki et al., 2021).

2.7.1 Relação da *P.gingivalis* com a EHNA

Nos Estados Unidos da América o número de pacientes diagnosticados com EHNA aumentou de 151.200 mil em 2010 para 1.867.000 mil em 2020. Deste modo, a taxa de prevalência anual sofreu um aumento de 1.51% em 2010 para 2.79% em 2020. Este aumento na prevalência de casos diagnosticados com EHNA deve-se ao facto de, nos últimos anos, ter ocorrido um aumento significativo do número de indivíduos obesos (Hamid et al., 2022; Nagasaki et al., 2021).

A EHNA é uma doença de difícil controlo, devido à complexidade da sua etiologia. No entanto, estudos demonstram que as células imunes ativadas por fatores de virulência da *P.gingivalis* (nomeadamente, o LPS) desempenham papéis importantes na fibrose hepática, por causa do aumento de produção de citocinas (Hamid et al., 2022) . Mais especificamente, os macrófagos agregam-se aos hepatócitos circundantes, que possuem grandes gotículas lipídicas, que são consideradas estruturas importantes. Estas estruturas patológicas, conhecidas como estruturas hepáticas “*crown-like*” (hCLSs) estão relacionadas com a fibrose hepática (Hamid et al., 2022). Na EHNA de estágio avançado, as células estreladas hepáticas (HSCs) são ativadas pelo LPS de *P. gingivalis* e pelas citocinas produzidas através das células imunes, resultando na proliferação e

diferenciação das células miofibroblásticas, com consequente produção de matriz extracelular, que leva à ativação das células HSCs por serem os seus principais componentes. (Hamid et al., 2022). Deste modo, as células imunes e a ativação das HSCs estão, estritamente, relacionadas com a fibrose hepática desempenhando importantes papéis na progressão da EHNA. Estudos recentes, também demonstraram que a estimulação do LPS da *P.gingivalis* induziu a produção do fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e galectina-3 (Gal-3) a partir das HSCs e hepatócitos, o que promove a progressão da fibrose hepática (Nagasaki et al., 2020). Demonstrou-se que a gingipaína e o recetor tipo-2 ativado por protease (PAR-2), também têm a capacidade de induzir a produção de TGF- $\beta 1$ (Nagasaki et al., 2020). Além disso, a expressão de PAR2 regulado por palmitato, é regulada de forma positiva nas HSCs (Nagasaki et al., 2021). Todos estes processos levam à progressão da fibrose hepática e desenvolvimento constante da doença. Diversos estudos demonstram que o tratamento prévio da doença periodontal, com erradicação *P.gingivalis*, pode inibir a progressão da EHNA causada pelo mesmo (Hamid et al., 2022; Nagasaki et al., 2020; Nagasaki et al., 2021).

2.8 Problemas na gravidez

A gravidez é um processo fisiológico único que surge acompanhado de inúmeras alterações temporárias na estrutura física da mulher, nos seus níveis hormonais e no seu sistema imunológico. Estas alterações são essenciais para manter o estado da mãe e do feto de forma estável. No entanto, algumas destas mudanças fisiológicas, hormonais ou dietéticas, podem modificar o risco para a ocorrência de doenças orais, devido ao facto de afetarem a composição microbiana nos vários locais do corpo da gestante (Saadaoui et al., 2021).

2.8.1 Relação da *P.gingivalis* com problemas na gravidez

O parto prematuro é definido como o nascimento ocorrido antes das 37 semanas de gestação, sendo a principal causa de morte neonatal, morbilidade infantil e sequelas a longo prazo. Aproximadamente, 15 milhões de bebés nascem de forma prematura,

anualmente, em todo o mundo, indicando, desta forma, uma taxa global de nascimentos prematuros de 11% (Walani, 2020).

A *P.gingivalis* consegue invadir o feto, placenta e tecidos maternos através do trato urogenital ou indiretamente através dos vasos sanguíneos presentes no periodonto (Jia et al., 2019). O LPS desta bactéria liga-se ao recetor TLR, aos recetores de complemento, e ao domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos (NOD), nos tecidos maternos e fetais (Jia et al., 2019). A ativação de todos estes recetores aumenta a resposta inflamatória, ocorrendo um aumento da infiltração de neutrófilos na placa basal decidual/placentária, mesenquima viloso e sinciciotrofoblastos da placenta, aumentando assim o risco de lesão tecidual mediada por radicais livres (Chopra et al., 2020).

A entrada da *P.gingivalis* na camada do sinciciotrofoblasto descola, parcialmente, separa e degenera a membrana amniótica, causando necrose da placa coriônica que tem como consequências corioamnionite (infecção das membranas e do líquido amniótico) e funisite (condição inflamatória do tecido conjuntivo do cordão umbilical) (Chopra et al., 2020). O aumento desta infiltração de neutrófilos prejudica o tecido conjuntivo do compartimento uterino por libertação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e da caspase 3 na unidade fetoplacentária (Chopra et al., 2020). A MMP degrada o colagénio no compartimento uterino e rompe o cório e a membrana externa com posterior vazamento de líquido amniótico. O aumento da concentração e MMP juntamente com a ativação dos recetores TLR2/4 induz o influxo de cálcio nos miócitos dos tecidos conjuntivos uterinos e reduz o comprimento cervical que, por sua vez a um maior risco de parto prematuro, restrição do crescimento fetal, aborto, infertilidade e falha na implantação (Figura 19) (Chopra et al., 2020; Jia et al., 2019).

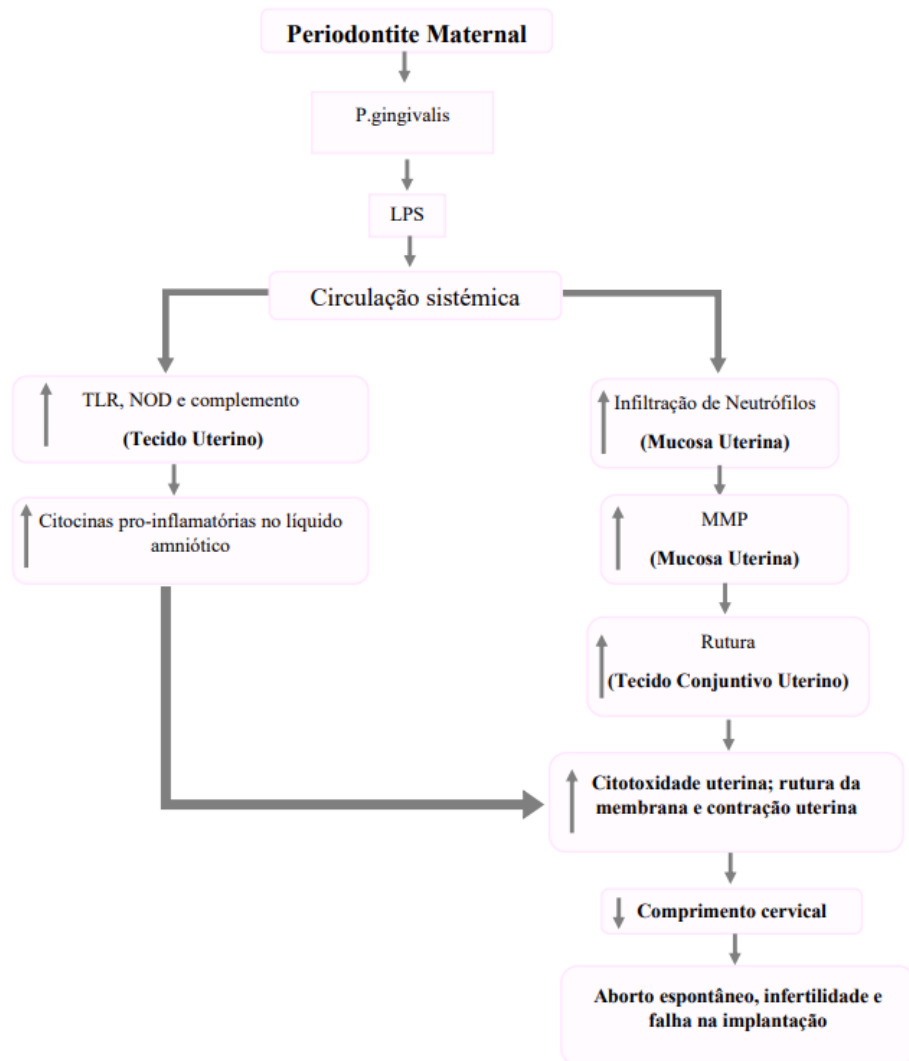


Figura 18 - Interação da *P.gingivalis* com diversos recetores nos tecidos maternos e fetais. A *P.gingivalis* interage com vários recetores nos tecidos maternos e fetais, de modo a exacerbar uma resposta inflamatória: o LPS desta bactéria liga-se ao recetor TLR, recetores do sistema do complemento, domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos (NOD) nos tecidos maternos e fetais. O aumento da infiltração dos neutrófilos lesa o tecido conjuntivo do compartimento uterino, libertando MMPs e ocorrendo a fagocitose induzida por neutrófilos. O aumento da concentração de MMP juntamente com a ativação dos recetores TLR2/4 induzem o influxo de cálcio para os miócitos do tecido conjuntivo uterino e reduzem o comprimento cervical. O comprimento cervical reduzido está relacionado com um risco aumentado de trabalho de parto prematuro, restrição no crescimento fetal, aborto recorrente, infertilidade e falha na implantação [adaptado de (Chopra et al., 2020)]

Não há ainda estudos que avaliem o papel da terapia microbiana sistémica na prevenção de problemas na gravidez induzidos pela *P.gingivalis*. Para isso, é necessário estudar e avaliar se esta bactéria é um fator de risco absoluto ou sistémico para a gestação e possíveis complicações (Chopra et al., 2020).

IV. Conclusão

A cavidade oral tem uma composição microbiana muito diversificada e que contém microrganismos patogénicos capazes de desenvolver inúmeras patologias. Assim sendo, é de extrema importância consultar um médico dentista de forma regular, de modo a prevenir tanto as doenças orais como as possíveis doenças sistémicas.

A bactéria anaeróbia Gram-negativa *Porphyromonas gingivalis*, atualmente, é considerada o agente etiológico da periodontite tendo sido, nos últimos anos, associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças sistémicas, tais como a doença de Alzheimer, diabetes, cancro, doenças hepáticas, doenças cardíacas, artrite reumatoide, entre outras.

A *P. gingivalis* possui múltiplos fatores de virulência que têm sido identificados como causadores dos efeitos patogénicos locais e/ou sistémicos. Estes estimulam a libertação de enzimas e metaloproteinases da matriz, que destroem os tecidos conjuntivos e osso alveolar.

Com esta dissertação pretendeu-se analisar e clarificar o papel da *P.gingivalis* na etiopatogénese de diversas doenças e quais os possíveis tratamentos e meios de prevenção das mesmas.

A *P.gingivalis* adere, invade e replica-se dentro das células humanas. A adesão desta bactéria às células hospedeiro é multimodal e envolve a interação da mesma com recetores existentes na superfície celular. A internalização da bactéria é rápida e requer componentes que são dependentes do contacto bacteriano e de vias de sinalização induzidas pelo hospedeiro.

A *P.gingivalis* subverte as respostas do hospedeiro aos desafios bacterianos através da inativação das células e moléculas imunitárias que leva à ativação de processos hospedeiros que, conseqüentemente, conduzem à destruição de tecidos.

A maioria das doenças sistémicas relacionadas com a *P.gingivalis* ainda precisam de ser mais estudadas, e por isso, sugere-se a realização de estudos *in vivo* e *in vitro* de modo a clarificar os mecanismos associados à patogénese das mesmas. No decorrer desta dissertação verificou-se que a literatura acerca dos novos tratamentos direcionados à erradicação da *P.gingivalis* em relação às diversas doenças sistémicas, é muito limitada.

V. Bibliografia

1. Ahmadi Badi, S., Bruno, S. P., Moshiri, A., Tarashi, S., Siadat, S. D., & Masotti, A. (2020). Small RNAs in Outer Membrane Vesicles and Their Function in Host-Microbe Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01209>
2. Almoallim, H., al Saleh, J., Badsha, H., Ahmed, H. M., Habjoka, S., Menassa, J. A., & El-Garf, A. (2021). A Review of the Prevalence and Unmet Needs in the Management of Rheumatoid Arthritis in Africa and the Middle East. In *Rheumatology and Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1007/s40744-020-00252-1>
3. Almutairi, K., Nossent, J., Preen, D., Keen, H., & Inderjeeth, C. (2021). The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. *Rheumatology International*, 41(5), 863–877. <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04731-0>
4. Alzheimer's Disease International. (2020). *Numbers of people with dementia worldwide*. <https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide/>
5. American Cancer Society. (2022). *Key Statistics for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers*. <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/about/key-statistics.html>
6. Bregaint, S., Boyer, E., Fong, S. B., Meuric, V., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2022). Porphyromonas gingivalis outside the oral cavity. *Odontology*, 10(1). <https://doi.org/10.1007/s10266-021-00647-8>
7. Caselli, E., Fabbri, C., D'Accolti, M., Soffritti, I., Bassi, C., Mazzacane, S., & Franchi, M. (2020). Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-020-01801-Y>
8. Centers for Disease Control and Prevention. (2022). *National Diabetes Statistics Report*. <https://www.cdc.gov/diabetes/data/statistics-report/index.html>

9. Chen, Q., Shao, Z., Liu, K., Zhou, X., Wang, L., Jiang, E., Luo, T., & Shang, Z. (2021). Salivary *Porphyromonas gingivalis* predicts outcome in oral squamous cell carcinomas: a cohort study. *BMC Oral Health*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01580-6>
10. Chen, T. Y., Kuo, P. J., Lin, C. Y., Hung, T. F., Chiu, H. C., Chiang, C. Y., Shih, K. C., & Fu, E. (2022). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide and gingival fibroblast augment MMP-9 expression of monocytic U937 cells through cyclophilin A. *Journal of Periodontology*, 93(3), 449–457. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0740>
11. Chopra, A., Radhakrishnan, R., & Sharma, M. (2020). *Porphyromonas gingivalis* and adverse pregnancy outcomes: a review on its intricate pathogenic mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 46 (2), 213–236. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1747392>
12. Dahlen, G., Fejerskov, O., & Manji, F. (2020). Current concepts and an alternative perspective on periodontal disease. *BMC Oral Health*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01221-4>
13. Ding, Y., Ren, J., Yu, H., Yu, W., Zhou, Y. (2018). *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity Ageing*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0110-7>
14. Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., ... Potempa, J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 5(1). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAU3333>
15. Fernandes Costa, M. J., Dantas, I., de Araújo, T., Da, L., Alves, R., Lins Da Silva, R., Dos, P., Calderon, S., Castillo, B., Borges, D., Rafaela, A., De, L., Martins, A., Cesar De Vasconcelos Gurgel, B., Diogenes, R., & Lins, A. U. (2021). Relationship of *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies. *Clinical Oral Investigations*, 25, 797-806. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03764-w> /Published

16. Fiorillo, L., Cervino, G., Laino, L., D'Amico, C., Mauceri, R., Tozum, T. F., Gaeta, M., Cicciù, M. (2019). Porphyromonas gingivalis, periodontal and systemic implications: A systematic review. *Dentistry Journal*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/dj7040114>
17. Frontiers in Cardiovascular Medicine. (2022). *Epidemiology and Clinical Researches in Atherosclerosis and Cardiovascular Disease*. <https://www.frontiersin.org/research-topics/40371/epidemiology-and-clinical-researches-in-atherosclerosis-and-cardiovascular-disease#overview>
18. Genco, R. J., & Sanz, M. (2020). Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontology 2000*, 83(1), 7–13. Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/prd.12344>
19. Geng, F., Liu, J., Guo, Y., Li, C., Wang, H., Wang, H., Zhao, H., & Pan, Y. (2020). Persistent exposure to Porphyromonas gingivalis promotes proliferative and invasion capabilities, and tumorigenic properties of human immortalized oral epithelial cells. *Journal of Dental Research*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00057>
20. Gong, T., Zeng, J., Tang, B., Zhou, X., & Li, Y. (2020). CRISPR-Cas systems in oral microbiome: From immune defense to physiological regulation. *Molecular Oral Microbiology*, 35 (2), 41.48. <https://doi.org/10.1111/omi.12279>
21. Hajishengallis, G., & Diaz, P. I. (2020). Porphyromonas gingivalis: Immune Subversion Activities and Role in Periodontal Dysbiosis. *Current Oral Health Reports*, 7(1), 12-21. <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00249-3>
22. Hamid, O., Eltelbany, A., Mohammed, A., Alsabbagh Alchirazi, K., Trakroo, S., & Asaad, I. (2022). The epidemiology of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in the United States between 2010-2020: a population-based study. *Annals of Hepatology*, 27(5). <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.10072>
23. Hasegawa, Y., & Nagano, K. (2021). Porphyromonas gingivalis FimA and Mfa1 fimbriae: Current insights on localization, function, biogenesis, and genotype. In *Japanese Dental Science Review*, 57, 190-200. (Vol. 57, pp. 190–200). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.003>

24. Hirai, K., Yamaguchi-Tomikawa, T., Eguchi, T., Maeda, H., & Takashiba, S. (2020). Identification and Modification of Porphyromonas gingivalis Cysteine Protease, Gingipain, Ideal for Screening Periodontitis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01017>
25. Horvat Aleksijević, L., Aleksijević, M., Škrlec, I., Šram, M., Šram, M., & Talapko, J. (2022). Porphyromonas gingivalis Virulence Factors and Clinical Significance in Periodontal Disease and Coronary Artery Diseases. *Pathogens*, 11(10), 1173. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101173>
26. Howard, K. C., Gonzalez, O. A., & Garneau-Tsodikova, S. (2021). Porphyromonas gingivalis: Where do we stand in our battle against this oral pathogen? *RSC Medicinal Chemistry*, 12 (5), 666-704. <https://doi.org/10.1039/d0md00424c>
27. Huck, O., Mulhall, H., Rubin, G., Kizelnik, Z., Iyer, R., Perpich, J. D., Haque, N., Cani, P. D., de Vos, W. M., & Amar, S. (2020). Akkermansia muciniphila reduces Porphyromonas gingivalis-induced inflammation and periodontal bone destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(2), 202–212. <https://doi.org/10.1111/JCPE.13214>
28. Imai, K., & Ogata, Y. (2020). How does Epstein–Barr virus contribute to chronic periodontitis? *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms21061940>
29. Isoshima, D., Yamashiro, K., Matsunaga, K., Taniguchi, M., Matsubara, T., Tomida, S., Ota, S., Sato, M., Shimoe, Y., Kohriyama, T., Arias, Z., Omori, K., Yamamoto, T., & Takashiba, S. (2021). Microbiome composition comparison in oral and atherosclerotic plaque from patients with and without periodontitis. *Odontology*, 109(1), 239–249. <https://doi.org/10.1007/S10266-020-00524-W>
30. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. (2019). Pathogenesis of important virulence factors of Porphyromonas gingivalis via toll-like receptors. *Front Cell Infect Microbiol*, 9(262). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
31. Jung, Y.-J., Miller, D. P., Perpich, J. D., Fitzsimonds, Z. R., Shen, D., Ohshima, J., & Lamont, R. J. (2019). Porphyromonas gingivalis Tyrosine Phosphatase Php1 Promotes Community Development and Pathogenicity. *mBio*, 10 (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02004-19>

32. Kadota, T., Hamada, M., Nomura, R., Ogaya, Y., Okawa, R., Uzawa, N., & Nakano, K. (2020). Distribution of *Helicobacter pylori* and Periodontopathic Bacterial Species in the Oral Cavity. *Biomedicines*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8060161>
33. Kadota, T., Hamada, M., Nomura, R., Ogaya, Y., Okawa, R., Uzawa, N., & Nakano, K. (2020). Distribution of *Helicobacter pylori* and Periodontopathic Bacterial Species in the Oral Cavity. *Biomedicines*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8060161>
34. Kanagasalingam, S., Chukkapalli, S. S., Welbury, R., & Singhrao, S. K. (2020). Porphyromonas gingivalis is a Strong Risk Factor for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 4(1), 501–511. <https://doi.org/10.3233/adr-200250>
35. Karpiński, T. M. (2019). Role of oral microbiota in cancer development. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010020>
36. Könönen, E., Gursoy, M., & Gursoy, U. K. (2019). Periodontitis: A multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *Journal of Clinical Medicine* 8(8). <https://doi.org/10.3390/jcm8081135>
37. Kriauciunas, A., Gleiznys, A., Gleiznys, D., & Janužis, G. (2019). The Influence of Porphyromonas Gingivalis Bacterium Causing Periodontal Disease on the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Systematic Review of Literature. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.4775>
38. Kriebel, K., Hieke, C., Müller-Hilke, B., Nakata, M., & Kreikemeyer, B. (2018). Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease - Connection of periodontitis and rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00053>
39. Krutyholowa, A., Strzelec, K., Dziedzic, A., Bereta, G. P., Łazarz-Bartyzel, K., Potempa, J., & Gawron, K. (2022). Host and bacterial factors linking periodontitis and rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.980805>
40. Kumbar, V. M., Peram, M. R., Kugaji, M. S., Shah, T., Patil, S. P., Muddapur, U. M., & Bhat, K. G. (2021). Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of Porphyromonas gingivalis. *Odontology*, 109(1), 18–28. <https://doi.org/10.1007/S10266-020-00514-Y>

41. Kwon, T. H., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, 71(6), 462–476. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>
42. Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16 (12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
43. Liu, J., Zeng, J., Wang, X., Zheng, M., & Luan, Q. (2018). P53 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 89(9), 1142–1151. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0026>
44. Lunar Silva, I., & Cascales, E. (2021). Molecular Strategies Underlying Porphyromonas gingivalis Virulence. *Journal of Molecular Biology*, 43 (7). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166836>
45. Lundmark, A., Hu, Y. O. O., Huss, M., Johannsen, G., Andersson, A. F., & Yucel-Lindberg, T. (2019). Identification of salivary microbiota and its association with host inflammatory mediators in periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00216>
46. Maquera-Huacho, P. M., Spolidorio, D. P., Manthey, J. A., & Grenier, D. (2022). Eriodictyol Suppresses Porphyromonas gingivalis-Induced Reactive Oxygen Species Production by Gingival Keratinocytes and the Inflammatory Response of Macrophages. *Frontiers in Oral Health*, 3. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.847914>
47. Matsushita, K., Yamada-Furukawa, M., Kurosawa, M., & Shikama, Y. (2020). Periodontal disease and periodontal disease-related bacteria involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Inflammation Research*, 13, 275-283. <https://doi.org/10.2147/JIR.S255309>
48. Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X., & Chen, L. (2020). Porphyromonas gingivalis and its systemic impact: Current status. *Pathogens*, 9(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110944>

49. Mendoza, I., Maritxalar Mendia, X., García de la Fuente, A. M., Quindós Andrés, G., & Aguirre Urizar, J. M. (2020). Role of Porphyromonas gingivalis in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review. In *Journal of Periodontal Research*, 55(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/jre.12691>
50. Mohanty, R., Asopa, S., Joseph, Md., Singh, B., Rajguru, J., Saidath, K., & Sharma, U. (2019). Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(11), 3480. https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_759_19
51. Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, A., Hernández, M., Bravo, D., & Vernal, R. (2019). Capsular-defective Porphyromonas gingivalis mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *Journal of Periodontology*, 90(5), 522–534. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0079>
52. Mulhall, H., Huck, O., & Amar, S. (2020). Porphyromonas gingivalis, a long-range pathogen: Systemic impact and therapeutic implications. *Microorganisms*, 8(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060869>
53. Nagasaki, A., Sakamoto, S., Arai, T., Kato, M., Ishida, E., Furusho, H., Fujii, M., Takata, T., & Miyauchi, M. (2021). Elimination of Porphyromonas gingivalis inhibits liver fibrosis and inflammation in NASH. *Journal of Clinical Periodontology*, 48(10), 1367–1378. <https://doi.org/10.1111/JCPE.13523>
54. Nagasaki, A., Sakamoto, S., Chea, C., Ishida, E., Furusho, H., Fujii, M., Takata, T., & Miyauchi, M. (2020). Odontogenic infection by Porphyromonas gingivalis exacerbates fibrosis in NASH via hepatic stellate cell activation. *Scientific Reports*, 10(1), <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60904-8>
55. Nie, R., Wu, Z., Ni, J., Zeng, F., Yu, W., Zhang, Y., Kadowaki, T., Kashiwazaki, H., Teeling, J.L., Zhou, Y. (2019). Porphyromonas gingivalis infection induces amyloid- β accumulation in monocytes/macrophages. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(2), 479–494. <https://doi.org/10.3233/JAD-190298>

56. Nowakowska, Z., Madej, M., Grad, S., Wang, T., Hackett, M., Miller, D. P., Lamont, R. J., & Potempa, J. (2021). Phosphorylation of major Porphyromonas gingivalis virulence factors is crucial for their processing and secretion. *Molecular Oral Microbiology*, 36(6), 316–326. <https://doi.org/10.1111/omi.12354>
57. Olsen, I., & Yamazaki, K. (2019). Can oral bacteria affect the microbiome of the gut? *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1586422>
58. Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 127, 1–7. <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>
59. Pignatelli, P., Romei, F. M., Bondi, D., Giuliani, M., Piattelli, A., & Curia, M. C. (2022). Microbiota and Oral Cancer as A Complex and Dynamic Microenvironment: A Narrative Review from Etiology to Prognosis. *International journal of molecular sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158323>
60. Radhakrishnan, P., Anbalagan, R., Barani, R., Mani, M., Seshadri, K., & Srikanth, P. (2019). Sequencing of Porphyromonas gingivalis from saliva in patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 37(1), 54–59. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_409
61. Rath, S., Bal, S.C.B., Dubey, D. (2021). Oral Biofilm: Development Mechanism, multidrug resistance, and their Effective Management with Novel Techniques. *Ramban Maimonides Medical Journal*, 12 (1). 10.5041/RMMJ.10428
62. Reyes L, Getachew H, Dunn WA, Progulske-Fox A. Porphyromonas Gingivalis W83 Traffics via ICAM1 in Microvascular Endothelial Cells and Alters Capillary Organization In Vivo. *J Oral Microbiol* (2020) 12 (1):1742528. doi: 10.1080/20002297.2020.1742528
63. Rocha, F. G., Berges, A., Sedra, A., Ghods, S., Kapoor, N., Pill, L., Davey, M. E., Fairman, J., & Gibson, F. C. (2021). A Porphyromonas gingivalis Capsule-Conjugate Vaccine Protects From Experimental Oral Bone Loss. *Frontiers in Oral Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.686402>

64. Roky, M., Trent, J. O., & Demuth, D. R. (2020). Identification of functional domains of the minor fimbrial antigen involved in the interaction of *Porphyromonas gingivalis* with oral streptococci. *Molecular Oral Microbiology*, 35(2), 66–77. <https://doi.org/10.1111/omi.12280>
65. Ryder, M. I. (2020). *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer disease: Recent findings and potential therapies. *Journal of Periodontology*, 91(1), 45–49. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0104>
66. Saadaoui, M., Singh, P., & al Khodor, S. (2021). Oral microbiome and pregnancy: A bidirectional relationship. *Journal of Reproductive Immunology*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103293>
67. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
68. Sao, P., Vats, S., & Singh, S. (2022). *Porphyromonas gingivalis* resistance and virulence: An integrated functional network analysis. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146734>
69. Sasaki, N., Katagiri, S., Komazaki, R., Watanabe, K., Maekawa, S., Shiba, T., Udagawa, S., Takeuchi, Y., Ohtsu, A., Kohda, T., Tohara, H., Miyasaka, N., Hirota, T., Tamari, M., & Izumi, Y. (2018). Endotoxemia by *Porphyromonas gingivalis* injection aggravates nonalcoholic fatty liver disease, disrupts glucose/lipid metabolism, and alters gut microbiota in mice. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02470>
70. Schenkein, H. A., Papapanou, P. N., Genco, R., & Sanz, M. (2020). Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. In *Periodontology 2000*, 83 (1), 90-106. <https://doi.org/10.1111/prd.12304>

71. Seyama, M., Yoshida, K., Yoshida, K., Fujiwara, N., Ono, K., Eguchi, T., Kawai, H., Guo, J., Weng, Y., Haoze, Y., Uchibe, K., Ikegame, M., Sasaki, A., Nagatsuka, H., Okamoto, K., Okamura, H., & Ozaki, K. (2020). Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165731>
72. Singhrao, S. K., & Olsen, I. (2019). Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. In *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563405>
73. Ślęzak, P., Śmiga, M., Smalley, J. W., Siemińska, K., & Olczak, T. (2020). *Porphyromonas gingivalis* hmuY and streptococcus gordonii gapdh—novel heme acquisition strategy in the oral microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21114150>
74. Song, P., R Fowkes, F. G., Rudan, I., Cai, Y., Rahimi, K. D., Zhu, Y., Zhu, Y., Song, P., Fang, Z., Wang, H., Cai, Y., Rahimi, K., Gerald Fowkes, F. R., I Fowkes, F. J., & Rudan, I. (2020). Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Articles Lancet Glob Health*, 8. www.thelancet.com/lancetgh
75. Stobernack, T. (2019). *Porphyromonas gingivalis – an oral keystone pathogen challenging the human immune system*. University of Groningen.
76. Sugiyama, N., Uehara, O., Morikawa, T., Paudel, D., Ebata, K., Hiraki, D., Harada, F., Yoshida, K., Kato, S., Nagasawa, T., Miura, H., Abiko, Y., & Furuichi, Y. (2022). Gut flora alterations due to lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-022-00703-x>
77. Surma, S., Romańczyk, M., Witalińska-Łabuzek, J., Czerniuk, M. R., Łabuzek, K., & Filipiak, K. J. (2021). Periodontitis, Blood Pressure, and the Risk and Control of Arterial Hypertension: Epidemiological, Clinical, and Pathophysiological Aspects-Review of the Literature and Clinical Trials. *Inflammation and cardiovascular diseases*. <https://doi.org/10.1007/s11906-021-01140-x>/Published

78. Tan, J., Patil, P. C., Luzzio, F. A., & Demuth, D. R. (2018). *In Vitro and In Vivo Activity of Peptidomimetic Compounds That Target the Periodontal Pathogen Porphyromonas gingivalis*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00400-18>
79. Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(1), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
80. Tsukamoto, H., Takeuchi, S., Kubota, K., Kobayashi, Y., Kozakai, S., Ukai, I., Shichiku, A., Okubo, M., Numasaki, M., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., Nochi, T., Watanabe, K. C., Aso, H., & Tomioka, Y. (2018). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1- $\text{IKK}\alpha$ -IRF3 axis activation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(26), 10186–10201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796631>
81. Usui, M., Onizuka, S., Sato, T., Kokabu, S., Ariyoshi, W., Nakashima, K. (2021). Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis — Periodontal bacteria and inflammation. *Japanese Dental Science Review*, 57, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.005>
82. Walani, S. R. (2020). Global burden of preterm birth. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 50(1), 31–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13195>
83. Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 120, 45–84. <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2019.12.001>
84. Yan, Y. J., Wang, B. W., Yang, C. M., Wu, C. Y., & Ou-Yang, M. (2021). Autofluorescence detection method for dental plaque bacteria detection and classification: Example of porphyromonas gingivalis, aggregatibacter actinomycetemcomitans, and streptococcus mutans. *Dentistry Journal*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/dj9070074>

85. Yang, D., Jiang, C., Ning, B., Kong, W., & Shi, Y. (2021). The PorX/PorY system is a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* and mediates the activation of the type IX secretion system. *Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100574>
86. Zhang, J., Xie, M., Huang, X., Chen, G., Yin, Y., Lu, X., Feng, G., Yu, R., & Chen, L. (2021). The Effects of *Porphyromonas gingivalis* on Atherosclerosis-Related Cells. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766560>
87. Zhang, L., Liu, Y., Zheng, H. J., & Zhang, C. P. (2020). The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00476>
88. Zhang, Z., Liu, D., Liu, S., Zhang, S., & Pan, Y. (2021). The Role of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585917>
89. Zheng, S., Yu, S., Fan, X., Zhang, Y., Sun, Y., Lin, L., Wang, H., Pan, Y., & Li, C. (2021). *Porphyromonas gingivalis* survival skills: Immune evasion. *Journal of Periodontal Research*, 56 (6), 1007-1018. <https://doi.org/10.1111/jre.12915>
90. Zittel, S., Moratin, J., Horn, D., Metzger, K., Ristow, O., Engel, M., Mrosek, J., Freier, K., Hoffmann, J., & Freudlsperger, C. (2022). Clinical outcome and prognostic factors in recurrent oral squamous cell carcinoma after primary surgical treatment: a retrospective study. *Clinical Oral Investigations*, 26(2), 2055–2064. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04186-y>

